

**ANÁLISIS DE LAS REGIONES DE LAS
PROTEÍNAS P1 α Y P2 β QUE DETERMINAN SU
ESPECIFICIDAD ESTRUCTURAL Y
FUNCIONAL EN EL TALLO RIBOSÓMICO DE
*Saccharomyces cerevisiae***

Memoria presentada por Verónica María Briceño Domínguez
para optar al grado de Doctora en Ciencias por la
Universidad Autónoma de Madrid.

El trabajo recogido en la presente memoria ha sido realizado en el Centro de Biología Molecular Severo Ochoa (CSIC-UAM) bajo la tutela y dirección del Dr. Juan Pedro García Ballesta, Profesor de Investigación del CSIC y la co-dirección del Dr. Cruz Santos Tejedor, profesor adjunto. Este trabajo ha contado con la financiación de un proyecto intramural del CSIC y con una beca de Formación de Profesorado Universitario del Ministerio de Educación y Ciencia.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

Facultad de Ciencias

Departamento de Biología Molecular

Madrid, mayo de 2007

Abstract

One of the most remarkable features of the large ribosomal subunit is the presence of a highly flexible protuberance called the stalk. This protein complex is universally conserved and plays a central role in the ribosome-mediated translation factor activity. However, the organization and functions of the proteins constituting the stalk remain unclear. In bacteria the stalk is made of one copy of protein L10 and two dimers of the acidic protein L7/L12; while in eukaryotes it is composed by P0 (L10 protein-equivalent) and two heterodimers of the acidic proteins P1 and P2. In *Saccharomyces cerevisiae*, two additional subgroups are distinguished, P1 α /P1 β and P2 α /P2 β which form biologically relevant heterodimers, P1 α -P2 β and P1 β -P2 α . The fact that in eukaryotes have two different ribosomal families, while in prokaryotes ones have only one, suggest a specialization of functions between both groups. Some data indicate that P1 and P2 proteins have different roles in the assembly and functions of the stalk. However, nowadays the information is very scarce about the possible roles of the two protein types in the stalk function, and some structural features are still unclear.

The experiments presented here were designed to explore the different roles that the P1 α and P2 β proteins may have in the stalk activity, and to characterize more precisely the regions involved in their binding to ribosomes and between them. To fulfil these aims, we designed two series of protein chimeras, comprising consecutively larger and complementary fragments of proteins P1 α and P2 β , which contained well defined secondary structure elements. These proteins were expressed in yeast strains lacking the corresponding native proteins and the presence of the chimeras in the ribosomes was tested. Similarly, the proteins chimeras were tested using the two-hybrids system to analyze the interactions with the corresponding native proteins. The results allowed us to conclude that the amino acid sequence of the amino-terminal domain that includes the first three α -helices of each protein is the minimal region necessary for binding to the ribosome. The same region is involved in the association of both proteins to form P1 α -P2 β heterodimers. The data strongly suggest that both processes, heterodimer formation and binding to the ribosome, seem to be necessarily linked. Furthermore, the expression of the chimeras allowed also analyzing the relative importance of the different acidic proteins in the translation and the results show a significant difference in the roles of P1 α and P2 β proteins.

Índices

ÍNDICE

ABSTRACT.....	viii
ÍNDICES.....	x
ÍNDICE.....	xi
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xv
ÍNDICE DE TABLAS.....	xviii
INTRODUCCION.....	1
I.1. SÍNTESIS DE PROTEÍNAS.....	2
I.2. FUNCIÓN Y ORGANIZACIÓN DEL RIBOSOMA.....	3
I.2.1. Función.....	3
I.2.2. Composición.....	4
I.2.2.1. Las proteínas ribosómicas.....	4
I.2.3. Estructura.....	5
I.3. EL TALLO RIBOSÓMICO.....	10
I.3.1. Composición.....	10
I.3.2. Estructura.....	11
I.3.3. Función.....	12
I.3.3.1. Interacción con los factores de traducción.....	13
I.3.3.2. Papel en la actividad GTPasa vinculada al tallo ribosómico.....	15
I.3.3.3. Otras funciones.....	15
I.4. EL TALLO RIBOSÓMICO DE <i>S. cerevisiae</i>	16
I.4.1. La Proteína P0: función y estructura.....	16
I.4.2. Las Proteínas Ácidas.....	17
I.4.2.1. Características generales.....	17
I.4.2.2. Asociación de las proteínas P1 y P2 al tallo.....	17
I.4.2.3. Función.....	19
I.4.2.3.1. Papel de la fosforilación de las proteínas ácidas.....	19
I.4.2.3.2. Efectos en la célula de la disrupción de las proteínas ácidas.....	20
I.4.2.3.3. Reactividad diferencial de las proteínas ácidas.....	21

OBJETIVOS.....	23
RESULTADOS.....	25
III.1. CONSTRUCCIÓN DE PROTEÍNAS QUIMÉRICAS. INTERCAMBIO DE LAS REGIONES AMINO-TERMINALES ENTRE P1 α Y P2 β	26
III.2. DETERMINACIÓN DEL SITIO DE UNIÓN AL RIBOSOMA EN LAS PROTEÍNAS P1 α Y P2 β	33
III.2.1. Estudio de la unión al ribosoma de las proteínas quiméricas en cepas de levadura carentes de una proteína ácida	34
III.2.1.1. Estudio de las proteínas de la serie P1 α /P2 β	34
III.2.1.2. Estudio de las proteínas de la serie P2 β /P1 α	38
III.2.2. Estudio de la unión al ribosoma de las proteínas quiméricas en cepas de levadura carentes de dos proteínas ácidas	41
III.2.2.1. Estudio de las proteínas de la serie P2 β /P1 α	42
III.2.2.2. Estudio de las proteínas de la serie P1 α /P2 β	44
III.3. DETERMINACIÓN DEL SITIO DE INTERACCIÓN ENTRE LAS PROTEÍNAS P1 α Y P2 β	46
III.3.1. Fusión de los genes de las proteínas quiméricas de la serie P2 β /P1 α y de la serie P1 α /P2 β al gen del domino de unión de GAL-4	47
III.3.2. Interacción de las proteínas quiméricas de la serie P1 α /P2 β con las proteínas P2 β y P1 α	50
III.3.3. Interacción de las proteínas quiméricas de la serie P2 β /P1 α con las proteínas P1 α y P2 β	53
III.4. ESTUDIO FUNCIONAL DEL DOMINO CARBOXILO-TERMINAL DE LAS PROTEÍNAS P1 Y P2.....	56
III.4.1. Efecto de la expresión de las proteínas 46aaP2 β /P1 α y 49aaP1 α /P2 β en cepas de levadura carentes de una proteína ácida.....	58
III.4.2. Efecto de la expresión de las proteínas 46aaP2 β /P1 α y 49aaP1 α /P2 β en cepas de levadura carentes de dos proteínas ácidas	60
III.4.3. Efecto de la expresión de las proteínas 46aaP2 β /P1 α , 64aaP2 β /P1 α , 49aaP1 α /P2 β y 58aaP1 α /P2 β en cepas de levadura carentes de tres proteínas ácidas	62

DISCUSIÓN.....	69
VI.1. Estabilidad de las proteínas quimeras obtenidas	71
VI.2. Identificación de la región mínima necesaria para que las proteínas P1 α y P2 β se unan de forma estable al ribosoma	72
VI.3. Análisis de las interacciones de las proteínas quiméricas con las proteínas ácidas endógenas	74
VI.4. Interacción entre las proteínas P1 α y P2 β	76
VI.5 Relación entre la formación de heterodímeros y su unión al ribosoma	79
VI.6. Actividad relativa del dominio carboxilo-terminal de las proteínas P1 α y P2 β	79
CONCLUSIONES.....	83
MATERIALES Y MÉTODOS.....	85
VI.1. MATERIAL BIOLÓGICO	86
VI.1.1. Cepas de <i>Escherichia coli</i>	86
VI.1.2. Cepas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	86
VI.2. VECTORES DE CLONACIÓN	87
VI.3. MEDIOS DE CULTIVO	87
VI.3.1. Medios de cultivo para <i>E. coli</i>	87
VI.3.2. Medios de cultivo para <i>S. cerevisiae</i>	88
VI.4. ENZIMAS, REACTIVOS Y OLIGONUCLEÓTIDOS	89
VI.4.1. Enzimas	89
VI.4.2. Reactivos	89
VI.4.3. Oligonucleótidos	90

VI.5. MÉTODOS DE TRANSFORMACIÓN CELULAR	90
VI.5.1. Transformación de <i>E. coli</i>	92
VI.5.2. Transformación de <i>S. cerevisiae</i>	92
VI.5.3. Disrupción génica	92
VI.6. MANIPULACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS	92
VI.6.1. Obtención de ADN plasmídico de <i>E. coli</i>	92
VI.6.2. Obtención de fragmentos de ADN mediante PCR	96
VI.6.3. Purificación de fragmentos de ADN a partir de geles de azarosa	96
VI.6.4. Obtención de ARN total de <i>S. cerevisiae</i>	96
VI.7. TÉCNICAS ELECTROFORÉTICAS	96
VI.7.1. Electroforesis de ácidos nucleicos: ADN y ARN	96
VI.7.1.1. Detección de moléculas de ARN o <i>Northern-blot</i>	96
VI.7.2. Electroforesis de proteínas	97
VI.7.2.1. SDS-PAGE	97
VI.7.2.2. Isoelectroenfoque	97
VI.8. DETECCIÓN INMUNOLÓGICA DE PROTEÍNAS TRANSFERIDAS A MEMBRANA <i>WESTERN-BLOT</i>	97
VI.9. OBTENCIÓN DE DISTINTAS FRACCIONES CELULARES DE <i>S. cerevisiae</i>	98
VI.9.1. Obtención de un extracto total de levadura (fracción S30)	98
VI.9.2. Obtención de ribosomas y fracción S100	99
VI.10. ENSAYOS DE SÍNTESIS DE POLIFENILALANINA	101
VI.11. ENSAYO DE DOBLE HÍBRIDO POR CRECIMIENTO EN SC-URA	101
BIBLIOGRAFÍA.....	103
APÉNDICE.....	113
VIII.1. ABREVIATURAS Y SIGLA	114

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. I.1: Comparación de los ribosomas 80S de <i>S. cerevisiae</i> y 70S de <i>E. coli</i>	7
Fig. I.2: Alineamiento múltiple de la estructura primaria de algunas proteínas ácidas eucariotas	10
Fig. I.3: Localización del tallo sobre el ribosoma 70S de <i>E. coli</i> y sobre el 80S de <i>S. cerevisiae</i>	12
Fig. I.4: Modelo "Interruptor molecular" de la región bisagra del dímero L7/L12	14
Fig. III.1: Predicción de la estructura secundaria de las proteínas P1 α y P2 β con el programa PSIPRED	27
Fig. III.2: Esquema de la construcción de los genes 5'UTRP1 α /P2 β y 5'UTRP2 β /P1 α	28
Fig. III.3: Esquema de la construcción del gen quimérico 49aaP1A/P2B	30
Fig. III.4: A: Estructura secundaria de la región amino-terminal de las proteínas P1 α y P2 β basada en la predicción hecha con el PSIPRED. B: Representación gráfica de la región amino-terminal de las proteínas quiméricas de la serie P1 α /P2 β	31
Fig. III.5: Esquema de la construcción del gen quimérico 46aaP2B/P1A	32
Fig. III.6: A: Estructura secundaria de la región amino-terminal de las proteínas P1 α y P2 β basada en la predicción hecha con el PSIPRED. B: Representación gráfica de la región amino-terminal de las proteínas quiméricas de la serie P2 β /P1 α	33
Fig. III.7: Análisis de <i>Western</i> de extractos S30 de la cepa D7 transformada con cada una de las construcciones de la serie pFI38/P1A/P2B y el control pFI38/P1ac96his6	35
Fig. III.8: Análisis de <i>Northern</i> del ARNm de la proteína quimérica 15aaP1 α /P2 β	35
Fig. III.9: Análisis de <i>Western</i> de ribosomas crudos (80S) y ribosomas lavados (80S L) de la cepa D7 transformada con cada una de las construcciones de la serie pFI38/P1A/P2B y el control pFI38/P1ac96his6	36
Fig. III.10: Isoelectroenfoque de ribosomas lavados de las cepas D7 que expresan las quimeras de la serie pFI38/P1A/P2B que se unen al ribosoma	38
Fig. III.11: Análisis de <i>Western</i> de extractos S30 de la cepa D5 transformada con cada una de las construcciones de la serie pFI38/P2B/P1A y el control pFI38/P2 β c100his6	39
Fig. III.12: Análisis de <i>Western</i> de ribosomas crudos (80S) y ribosomas lavados (80S L) de la cepa D5 transformada con cada una de las construcciones de la serie pFI38/P2B/P1A y el control pFI38/P2 β c100his6	40

Fig. III.13: Isoelectroenfoque de ribosomas lavados de las cepas D5 que expresan las quimeras de la serie pFI38/P2B/P1A que se unen al ribosoma	41
Fig. III.14: Análisis de <i>Western</i> de ribosomas crudos (80S) y ribosomas lavados (80S L) de la cepa D45 transformada con cada una de las construcciones de la serie pFI38/P2B/P1A y el control pFI38/P2βc100his6	43
Fig. III.15: Isoelectroenfoque de ribosomas lavados de las cepas D45 que expresan las quimeras de la serie pFI38/P2B/P1A que tienen los fragmentos mayores de P2β en el extremo amino-terminal	44
Fig. III.16: Análisis de <i>Western</i> de ribosomas crudos (80S) y ribosomas lavados (80S L) de la cepa D67 transformada con cada una de las construcciones de la serie pFI38/P1A/P2B y el control pFI38/P2βc100his6	45
Fig. III.17: Composición en proteínas ácidas de ribosomas de las cepas D67 que expresan las 4 últimas construcciones de la serie pFI38/P1α/P2β	46
Fig. III.18: Esquema de los pasos seguidos para la clonación del gen quimérico 46aaP2B/P1A en el vector pBDC	48
Fig. III.19: Esquema de las cepas de levadura utilizadas para estudiar las diferentes interacciones entre las proteínas P1α y P2β mediante el sistema de doble-híbrido	49
Fig. III.20: Análisis de <i>Western</i> de extractos S30 de las proteínas quimera de la serie P1α/P2β fusionadas al dominio de unión de GAL4	51
Fig. III.21: Análisis de <i>Western</i> de extractos S30 de las proteínas silvestre P1α y P2β fusionadas al dominio de activación de GAL4	51
Fig. III.22: Interacciones de las proteínas quiméricas de la serie P1α/P2β con las proteínas silvestres P1α y P2β mediante el sistema de doble-híbrido	52
Fig. III.23: Análisis de <i>Western</i> de extractos S30 de las proteínas quimera de la serie P2β/P1α fusionadas al dominio de unión de GAL4	54
Fig. III.24: Análisis de <i>Western</i> de extractos S30 de las proteínas silvestre P1α y P2β fusionadas al dominio de activación de GAL4	54
Fig. III.25: Interacciones de las proteínas quiméricas de la serie P1α/P2β con las proteínas silvestres P1α y P2β mediante el sistema de doble-híbrido	55
Fig. III.26: Alineamiento de las secuencias de los dominios C-terminal de las proteínas quiméricas que se unen establemente al ribosoma	57
Fig. III.27: Representación de la composición del tallo ribosómico	58
Fig. III.28: Curva de crecimiento en medio YPD de las cepas D5/pFI38/46aaP2B/P1A, W303, D5/pfi38/P2βc100-his6 y D5 sin transformar	59

Fig. III.29: Curva de crecimiento en medio YPD de las cepas D7/pFI38/49aaP1A/P2B, W303, D7/pfl38/P1 α c96-his6 y D7 sin transformar	60
Fig. III.30: Curva de crecimiento en medio YPD de las cepas D45/pFI38/46aaP2B/P1A, W303, D45/pfl38/P2 β c100-his6 y D45 sin transformar	61
Fig. III.31: Curva de crecimiento en medio YPD de las cepas D67/pFI38/49aaP1A/P2B, W303, D67/pfl38/P1 α c96-his6 y D67 sin transformar	62
Fig. III.32: Curva de crecimiento en medio YPD de las cepas D456/pFI38/46aaP2B/P1A, W303, D456/pfl38/P2 β c100-his6 y D456 sin transformar	63
Fig. III.33: Actividad traduccional de la cepa D456/pfl38/46aaP2B/P1A	64
Fig. III.34: Curva de crecimiento en medio YPD de las cepas D456/pFI38/64aaP2B/P1A, W303, D456/pfl38/P2 β c100-his6 y D456 sin transformar	65
Fig. III.35: Curva de crecimiento en medio YPD de las cepas D467/pFI38/49aaP1A/P2B, D467/pFI38/58aaP1A/P2B, W303, D467/pfl38/P1 α c96-his6 y D467 sin transformar	67
Fig. IV.1: Representación del dominio amino-terminal de la proteína L7/L12	77
Fig. IV.2: Representación de los dímeros P1 α -P2 β (I), P1 α -64aaP2 β /P1 α (II) y P1 α -46aaP2 β /P1 α (III)	81

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla VI.1. Cepas de <i>S. cerevisiae</i>	86
Tabla VI.2. Plásmidos utilizados para la transformación de levadura	87
Tabla VI.3. Secuencia de oligonucleótidos diseñados a partir del vector pFI, usados como cebadores universales para la secuenciación y amplificación de fragmentos de ADN clonados en vectores pFI	90
Tabla VI.4. Secuencia de los oligonucleótidos específicos utilizados en la construcción de los genes 5'UTRP1A/P2Bc100-his6 y 5'UTRP2B/P1Ac96-his6	90
Tabla VI.5. Secuencia de los oligonucleótidos específicos utilizados en la construcción de los genes quiméricos de la serie P1A/P2B	90
Tabla VI.6. Secuencia de los oligonucleótidos específicos utilizados en la construcción de los genes quiméricos de la serie P2B/P1A	91
Tabla VI.7. Secuencia de los oligonucleótidos utilizados en la construcción de los genes quiméricos fusionados al dominio de unión de GAL 4. En azul se señala la secuencia correspondiente a la diana Nrul	91
Tabla VI.8. Secuencia del oligonucleótido utilizado como sonda para la detección por <i>Northern</i> del ARNm de la proteína P1 α	91
Tabla VI.9. Cebadores y molde utilizados en la construcción de los genes quiméricos de la serie P1A/P2B. Se marcan con una "P" los cebadores que fueron fosforilados	94
Tabla VI.10. Cebadores y molde utilizados en la construcción de los genes quiméricos de la serie P2B/P1A. Se marcan con una "P" los cebadores que fueron fosforilados	94
Tabla VI.11. Cebadores y molde utilizados en la construcción de los genes quiméricos de la serie P1A/P2B fusionados al dominio de unión de GAL 4 (GAL4BD)	95
Tabla VI.12. Cebadores y molde utilizados en la construcción de los genes quiméricos de la serie P2B/P1A fusionados al dominio de unión de GAL 4 (GAL4BD)	95

Introducción

Empieza por el principio- dijo el Rey con toda seriedad-
y sigue hasta llegar al final: allí detente.

Alicia en el País de las Maravillas, Lewis Carroll

I.1. SÍNTESIS DE PROTEÍNAS

La traducción de la información genética codificada en el ADN y transcrita en forma de ARNm es llevada a cabo por los ribosomas mediante un proceso complejo en el que intervienen numerosos componentes celulares dando lugar a polipéptidos mediante el ensamblaje de aminoácidos. La síntesis de proteínas es uno de los procesos celulares más conservados a lo largo de la evolución y tiene lugar en todos los organismos procariotas y eucariotas. La puesta en funcionamiento de la maquinaria traduccional consume un porcentaje significativo de la energía generada durante el metabolismo, razón por la cual la traducción está altamente regulada, principalmente durante la primera etapa (Merrick, 2004).

La síntesis de proteínas se desarrolla en tres etapas: iniciación, elongación y terminación.

Iniciación: el proceso de traducción comienza cuando las dos subunidades del ribosoma se ensamblan junto con el ARNm para formar la partícula ribosómica madura. A continuación el ribosoma facilita el reconocimiento del primer codón del ARNm (generalmente AUG) y la unión del primer aminoacil-ARNt complementario a éste. Durante esta etapa intervienen los factores de iniciación, y es la que presenta mayor complejidad siendo estrictamente regulada por diferentes mecanismos.

Elongación: consiste en una serie de reacciones que tienen por finalidad añadir aminoácidos sobre el péptido naciente según el orden establecido en la secuencia de codones del ARNm. A medida que transcurre esta etapa el ribosoma se desplaza a lo largo del ARNm en sentido 3´ para ir leyendo la secuencia de codones, acoplando los aminoacil-ARNts complementarios y catalizando la formación de un enlace peptídico entre los aminoácidos que estos aminoacil-ARNts portan, con la participación de los factores de elongación.

Terminación: El final de la cadena polipeptídica es señalada por un codón de parada en la secuencia del ARNm que es reconocido por los factores de terminación, esto ocasiona que se detenga la elongación y se libere el polipéptido sintetizado. Los ribosomas que han participado en la síntesis de un polipéptido se disocian del ARNm y las subunidades ribosómicas se desensamblan, siendo capaces de reciclarse para participar en un nuevo proceso de traducción.

Dada la gran importancia que tiene el proceso de síntesis de proteínas en el metabolismo celular, durante muchos años se han dedicado grandes esfuerzos para elucidar todos los detalles de sus etapas a nivel molecular y también para identificar los componentes ribosómicos que están involucrados. El estudio del ribosoma tiene además importancia médica debido a que es blanco de muchos antibióticos de importancia clínica (Tenson y Mankin, 2006) y a que algunas de las proteínas ribosómicas como Rpl3 y las proteínas P están involucradas en procesos autoinmunes en enfermedades como el Lupus eritematoso sistémico y en la enfermedad de Chagas (Elkon y col., 1985; Kaplan y col., 1997; Kurup y Banerjee, 2000).

I.2. FUNCIÓN Y ORGANIZACIÓN DEL RIBOSOMA

I.2.1. Función

El ribosoma, eje central de la síntesis de proteínas, es una partícula ribonucleoproteica que lleva a cabo las siguientes funciones:

- Posicionamiento y selección del AUG iniciador.
- Selección del aminoacil-ARNt complementario al codón específico del ARNm (exactitud).
- Adición de aminoácidos al polipéptido sintetizado mediante la formación del enlace peptídico (catálisis).
- Desplazamiento sobre el ARNm en dirección 3´ para colocar el siguiente codón en la posición correcta (traslocación).

Adicionalmente, el ribosoma parece estar relacionado con otros procesos biológicos en la célula, como el transporte y empaquetamiento de proteínas (Menetret y col., 2000; Beckmann y col., 2001; Hardesty y Kramer, 2001).

I.2.2. Composición

Todos los ribosomas están formados por dos subunidades de diferente tamaño que se ensamblan para formar una partícula ribosómica madura capaz de llevar a cabo la traducción.

En procariotas la subunidad menor tiene un coeficiente de sedimentación 30S, esta compuesta un ARNr 16S y por 21 proteínas, mientras que la subunidad mayor 50S se compone de dos ARNr 23S y 5S y 33 proteínas (Spahn y col., 2001). Cuando ambas subunidades se asocian forman el ribosoma 70S.

El ribosoma eucariótico maduro es una partícula con un coeficiente de sedimentación 80S. La subunidad menor 40S está formada por un ARNr 18S y 32 proteínas, y la subunidad mayor 60S contiene tres moléculas de ARNr 28S (26S en *S. cerevisiae*), 5,8S y 5S y 46 proteínas (Spahn y col., 2001).

I.2.2.1. Las proteínas ribosómicas

Las proteínas ribosómicas son, por definición, todas aquellas proteínas que permanecen unidas a la partícula ribosómica tras un lavado con una solución salina de alta fuerza iónica (KCl o NH₄Cl 0,5 M) que no afecta su actividad de síntesis proteica en ensayos *in vitro*. En estas condiciones se pueden distinguir las proteínas ribosómicas de aquellas que se unen transitoriamente al ribosoma durante el proceso de traducción.

Las proteínas del ribosoma interaccionan con el ARNr estableciendo contactos en la mayoría de los casos con más de un dominio del ARNr. Prácticamente la totalidad de las proteínas que forman parte del ribosoma son de carácter básico debido a su proximidad al ARNr, y en general contienen muy pocas regiones con potencial negativo. La excepción la constituye la proteína L12 procariótica y sus homólogas eucarióticas las proteínas P1y P2, que forman parte del tallo o protuberancia lateral, que tienen un fuerte carácter ácido y no establecen contacto directo con el ARNr.

Gran parte de los estudios funcionales sobre las proteínas del ribosoma parecen indicar que su papel es principalmente estructural. En muchos casos se

han descrito como simples conectores responsables del correcto plegamiento de las moléculas de ARNr (Dahlberg, 1989), recayendo sobre el ARNr prácticamente todo el protagonismo funcional. No obstante, actualmente se acepta que el ribosoma presenta regiones funcionales formadas por dominios mixtos ARNr-proteína, en los que regiones concretas de las diferentes macromoléculas constituyen los lugares de interacción de los ligandos que intervienen en el proceso de síntesis de proteínas (Draper 1996). Recientemente se ha hecho una revisión de varios estudios en donde destacan importantes funciones en las que intervienen las proteínas ribosómicas (Brodersen y Nissen, 2005). Entre dichas funciones se encuentra su activa participación en los siguientes procesos: reconocimiento del ARNm, reconocimiento y decodificación del ARNt, unión a factores de traducción y acción directa sobre la hidrólisis del GTP asociado a los factores solubles. También se ha descrito que participan en algunas de las funciones del centro peptidil transferasa y en las del túnel de salida de los péptidos sintetizados.

Al contrario de lo que ocurre en procariotas, donde un número significativo de las proteínas ribosómicas son dispensables para la viabilidad celular (Dabbs, 1986), en levadura la mayor parte de las proteínas que conforman al ribosoma son esenciales, en especial aquellas que son necesarias para el ensamblaje de las subunidades ribosómicas, y muchas de las que son dispensables son importantes para la estabilidad, función y óptimo ensamblaje del ribosoma (Baronas-Lowell y Warner, 1990).

I.2.3. Estructura

La estructura tridimensional del ribosoma completo y de sus subunidades ha sido estudiada por varias técnicas de microscopía electrónica desde 1960, pero no ha sido hasta 1995 cuando gracias a la criomicroscopía electrónica, se ha podido conocer su compleja estructura, permitiendo localizar los sitios de unión de importantes ligandos como el ARNt o los factores de elongación (Frank, 2003).

La mayor parte de los estudios estructurales del ribosoma se han realizado en bacterias, aunque se están obteniendo importantes avances en estudios realizados con ribosomas eucarióticos. Las primeras comparaciones de la morfología general de los ribosomas procariotas y eucariotas mostraron una gran

semejanza entre ambas partículas (Dube y col., 1998; Verschoor y col., 1998). En la subunidad menor, descrita antropológicamente, se pueden apreciar estructuras comunes: cabeza, cuello, cuerpo, hombro y plataforma. La subunidad mayor de ambos ribosomas presenta una estructura más compacta que consiste en una base redondeada con tres protuberancias denominadas L1, protuberancia central y tallo o protuberancia lateral (fig. I.1).

Estudios de inmunomicroscopía electrónica de ribosomas de bacterias permitieron mapear algunos dominios funcionales de la subunidad mayor: el centro peptidil transferasa ubicado en la base de la protuberancia central (Olson y col., 1982; Oakes y col., 1987) y el centro GTPasa, sitio de interacción de los factores de elongación, localizado en la base de la protuberancia lateral o tallo (Girshovich y col., 1981; Girshovich y col., 1986). Más tarde, estudios de criomicroscopía electrónica mostraron la misma localización de estos centros funcionales en el ribosoma eucariota (Spahn y col., 2001), quedando patente la homología entre las partículas 70S y 80S.

El perfeccionamiento de la técnica de criomicroscopía electrónica y de cristalografía de rayos X, ha permitido obtener reconstrucciones de la partícula ribosómica con una elevada resolución, lo que ha suministrado una valiosa información sobre detalles de las interacciones ARN-ARN y proteína-ARN en cada subunidad, así como también detalles de la interacción del ribosoma con diferentes ligandos. En *E. coli* se han obtenido imágenes de la partícula 70S por cristalografía de rayos X con una resolución de 3,5 Å (Schuwirth y col., 2005), de 2,4 Å para la subunidad 50S (Ban y col., 2000) y de 3,3 Å para la subunidad 30S (Schlueder y col., 2000). En cuanto al ribosoma eucariótico se han obtenido imágenes del ribosoma de *S. cerevisiae* por criomicroscopía electrónica con resoluciones de 15 Å (fig. I.1) y 11,7 Å (Spahn y col., 2001; Spahn y col., 2004). En estas imágenes se observan algunas estructuras adicionales a las descritas con anterioridad en relación a la morfología general del ribosoma; por ejemplo, en la subunidad menor aparecen el pico y el dedo o espuela y en la subunidad mayor puede apreciarse una especie de túnel que la atraviesa a través del cual crece la cadena polipeptídica. También se ha podido observar con más detalle la región donde se asocian las dos subunidades ribosómicas, las cuales están unidas por puentes formados en su mayoría por contactos ARN-ARN y por algunas interacciones ARN-proteínas (Spahn y col., 2001; Yusupov y col., 2001).

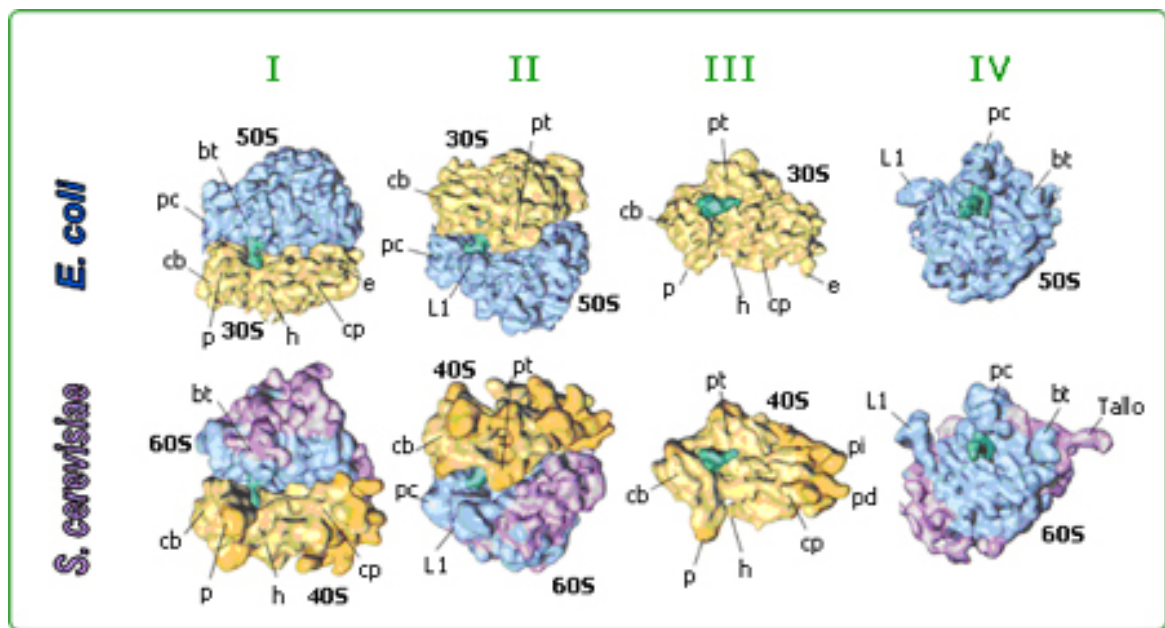


Fig. I.1: Comparación de los ribosomas 80S de *S. cerevisiae* y 70S de *E. coli*. Mapas de los ribosomas 70S de *E. coli* (parte superior) y 80S de *S. cerevisiae* (parte inferior), obtenidos por criomicroscopía electrónica. De izquierda a derecha: Los ribosomas son mostrados por el lado del tallo (I) y por el lado de L1 (II). Las subunidades menores en amarillo (III) y las subunidades mayores en azul (IV) son mostradas por el lado donde interaccionan las subunidades; en verde en sitio P. Las partes adicionales del ribosoma eucariótico 80S debidas al ARN y proteínas extra, se muestran en ocre (subunidad 40S) y púrpura (subunidad 60S). Códigos: Subunidad 40S: cp, cuerpo; p, pico; cb, cabeza; pi, pie izquierdo; pd, pie derecho; pt, plataforma; h, hombro; e, espuela. Subunidad 60S: pc, protuberancia central; L1, protuberancia L1; bt, base del tallo (Spanh y col., 2001).

De la comparación de las partículas 80S y 70S (fig. I.1), la diferencia más evidente, es que la primera es de un tamaño general mayor, debido a la presencia de ARN y proteínas extras, los cuales probablemente fueron adquiridos por el ribosoma eucariota en el curso de la evolución. Las proteínas y ARNr adicionales presentes en el ribosoma 80S están localizadas predominantemente en la superficie de las subunidades expuesta al citoplasma. La mayor parte del material extra presente en la subunidad 40S está localizado en la parte inferior mostrando una mayor subdivisión del cuerpo, donde aparecen el pie derecho y el izquierdo. La subunidad 60S presenta un incremento de masa en uno de sus lados que hace que ésta tenga una forma más elíptica que la clásica forma globular de la subunidad 50S procariótica (Spahn y col., 2001). La composición de la región de interacción entre las dos subunidades es bastante similar a la de la partícula 70S.

Debido a la especialización de las funciones celulares de los organismos superiores, no sorprende que la estructura y función del ribosoma eucariota sea

más compleja que en procariotas. Por tanto, no es de extrañar que a medida que se vayan mejorando las técnicas para el estudio de ribosomas, las diferencias existentes entre ambos dominios de la vida resulten cada vez más evidentes.

I.3. EL TALLO RIBOSÓMICO

El tallo ribosómico es un complejo netamente proteico muy flexible que forma una protuberancia lateral localizada en la subunidad mayor del ribosoma. Esta estructura tiene un papel relevante en la síntesis de proteínas estabilizando la unión transitoria de algunos factores de traducción, y su importancia queda reflejada en que está universalmente conservado en los ribosomas de todos los dominios de la vida.

I.3.1. Composición

En todos los organismos, el tallo ribosómico está formado por una proteína central que se ancla al ARNr por su dominio amino-terminal (DAT) y que interacciona a través de su dominio carboxilo-terminal (DCT) con un grupo de proteínas más pequeñas de fuerte carácter ácido (pI 3-4), cuyo número varía según el organismo.

En bacterias la proteína L10 (17 kDa) ocupa la posición central y a través de su DAT interacciona con el ARNr 23S en una región que solapa con el sitio de interacción de la proteína L11, existiendo entre L10 y L11 una unión cooperativa (Draper, 1996). Por otro lado, la base del tallo en eucariotas está constituida por la región amino-terminal de P0 (32 kDa) y por la proteína L12 (homólogas a las proteínas L10 y L11 procariotas, respectivamente) que se unen al dominio 26S/28S del ARNr en sitios equivalentes a los encontrados en bacteria (el-Baradi y col., 1987). La región del ARNr 23S, junto a la proteína L11 y el dominio amino-terminal de L10, constituyen el denominado centro GTPasa o GAR (GTPase Associated Region), involucrado en la hidrólisis de las moléculas de GTP unidas a los factores de elongación EFG y EFTu. El centro GTPasa es un dominio funcional presente en todos los organismos que componen los dominios de la vida y su elevada conservación se debe a que cumple una función esencial en el proceso de traducción. De los aproximadamente 60 nucleótidos que conforman esta región,

24 están conservados en más del 95% entre las secuencias de bacterias, arqueas, eucariotas y cloroplastos (Gonzalo y Reboud, 2003).

El tallo ribosómico de bacterias es un complejo pentamérico compuesto por dos homodímeros de la proteína ácida L7/L12 (12 kDa) (Marquis y col., 1981) que se asocian de forma muy estable a la proteína L10 (Pettersson y col., 1976; Gudkov y col., 1978). Aunque en prácticamente todas las bacterias el tallo es un pentámero proteico, en *Thermotoga maritima* se ha descrito que el tallo está compuesto por un heptámero (L10-(L7/L12)₃) (Ilag y col., 2005).

En organismos eucariotas, el tallo también está formado por cinco proteínas (Rich y Steitz, 1987; Uchiumi y col., 1987), aunque su composición es más compleja. La proteína P0 interacciona con dos heterodímeros de las proteínas ácidas P1 y P2 (12 kDa) (Tchorzewski y col., 2000). Los eucariotas superiores poseen sólo dos tipos de proteínas (Tsurugi y col., 1978), mientras que los eucariotas inferiores poseen múltiples formas. En plantas ha sido descrita una tercera proteína, P3 (Szick y col., 1998), cuya función no ha sido identificada hasta ahora. La comparación de la secuencia de aminoácidos de las proteínas que componen el tallo del ribosoma eucariótico, reveló una alta homología entre ellas, siendo especialmente elevada en el extremo carboxilo donde los últimos 13 residuos son prácticamente idénticos (Ballesta y Remacha, 1996; Gonzalo y Reboud, 2003) y P0 es fosforilada en un residuo de serina equivalente al de P1/P2 (fig. I.2) (Rodríguez-Gabriel y col., 1998). Entre las proteínas P1 y P2 existe una homología del 60% entre sus secuencias, siendo en el DAT donde hay más diferencias, hecho que llevó a clasificarlas en dos tipos, P1 y P2 (fig. I.2) (Moller y col., 1975). En procariotas la proteína L7/L12 es esencial, mientras que las proteínas P1/P2 de eucariotas no son esenciales, y su función puede ser suplida por P0 gracias a la alta homología que existe entre sus extremos carboxilo.

En P1 el DAT es principalmente hidrofóbico, mientras que en P2 este dominio es muy hidrofílico (fig. I.2) (Gonzalo y col., 2001). La existencia de dos tipos diferentes de proteínas ácidas en estos organismos, sugiere que pueden estar relacionadas con funciones diferentes a las descritas en procariotas.

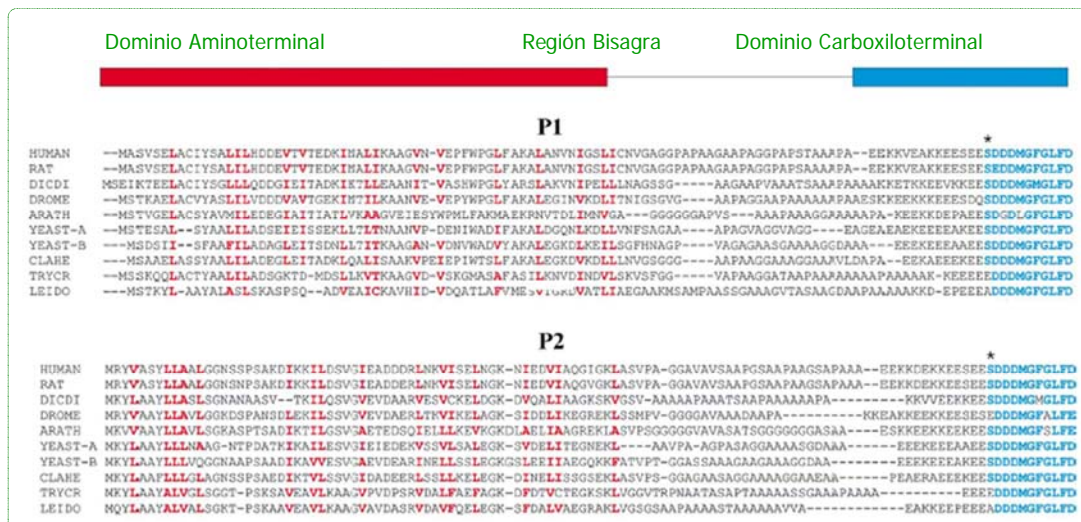


Fig.1.2: Alineamiento múltiple de la estructura primaria de algunas proteínas ácidas eucariotas. HUMAN: humano; RAT: rata; DICDI: *Dictyostelium discoideum*; DROME: *Drosophila melanogaster*; ARATH: *Arabidopsis thaliana*; YEAST-A: *S. cerevisiae* P1 α y P2 α ; YEAST-B: *S. cerevisiae* P1 β y P2 β ; CLAHE: *Cladosporium herbarum*; TRYCR: *Trypanosoma cruzi*; LEIDO: *Leishmania donovani*. La extensión del dominio amino terminal es indicado por el rectángulo rojo, al igual que los residuos hidrofóbicos. El dominio carboxilo-terminal es señalado por el rectángulo azul y también los últimos 11 residuos altamente conservados. La serina fosforilable es señalada por un asterisco (Tchorzewski y col., 2002).

Las proteínas que componen el tallo en eucariotas fueron inicialmente denominadas proteínas P ("phosphoprotein") por su capacidad de ser fosforiladas, modificación que no se observa en ninguna de las proteínas ribosómicas de procariotas (Zinker y Warner, 1976).

A diferencia del resto de las proteínas ribosómicas que son rápidamente degradadas cuando no se unen al ribosoma (Warner, 1989), las proteínas ácidas se acumulan en el citoplasma. Este reservorio se ha observado tanto en bacterias (Ramagopal, 1976) como en eucariotas (Sanchez-Madrid y col., 1981; Tsurugi y Ogata, 1985), aunque ha sido sólo en eucariotas donde se ha detectado un activo proceso de intercambio entre las proteínas ácidas que están unidas al ribosoma y las que forman parte del reservorio del citoplasma (Zinker y Warner, 1976; Tsurugi y Ogata, 1985; Diaconu y col., 2005). Adicionalmente se encontró que las proteínas ácidas eucarióticas están fosforiladas cuando están unidas al ribosoma, mientras que las que forman parte del reservorio citoplasmático no lo están (Zinker, 1980).

Tanto en procariotas como en eucariotas el dominio amino-terminal de las proteínas ácidas es el responsable de su unión al ribosoma a través de la

interacción con L10 o P0 y de la dimerización de estas proteínas. La región central, denominada bisagra, conecta los dominios amino y carboxilo; esta región es rica en alaninas, glicina y prolinas, composición que confiere a estas proteínas una elevada flexibilidad, característica imprescindible para su funcionamiento. El dominio carboxilo-terminal, está expuesto al citoplasma y es el responsable de la interacción con los factores de traducción (Wahl y Moller, 2002; Gonzalo y Reboud, 2003). Aunque las proteínas L7/L12 y sus equivalentes eucarióticas presentan una organización estructural y funcional muy similar, difieren mucho en su secuencia primaria (Wool y col., 1991) y en el tamaño relativo de los dominios que las componen. El DCT en bacterias tiene una longitud de aproximadamente 70 aminoácidos, mientras que en eucariotas se compone de alrededor de 20 aminoácidos. Lo contrario ocurre en el DAT, que es más grande en eucariotas que en bacterias (Shimmin y col., 1989).

I.3.2. Estructura

Debido a la gran flexibilidad del tallo ribosómico su estructura no ha podido ser resuelta en ninguno de los últimos modelos derivados de cristales de ribosomas procarióticos (Ban y col., 2000; Yusupov y col., 2001; Schuwirth y col., 2005). Sin embargo, recientemente se ha elaborado un modelo tridimensional del tallo gracias a la resolución de la estructura de un complejo proteico formado por L10 y tres dímeros del dominio amino-terminal de L7/L12 de *T. maritima* sobre la subunidad 50S de *E. coli* (fig. I.3); estos elementos fueron identificados en reconstrucciones de ribosomas de *E. coli* obtenidas por criomicroscopía electrónica. Para proponer este modelo se contó también con la información obtenida por RMN de la estructura en solución de una molécula L7/L12 completa (Bocharov y col., 2004; Diaconu y col., 2005).

En eucariotas ha sido igualmente complicado obtener modelos del tallo ribosómico. No obstante, reconstrucciones de la estructura del tallo de *S. cerevisiae* se han podido obtener por criomicroscopía electrónica utilizando el antibiótico sordarina que inhibe la traducción en células eucarióticas impidiendo que el EF-2 se disocie de la partícula ribosómica (fig. I.3); de esta manera el tallo queda inmovilizado y puede ser visualizado por esta técnica (Gomez-Lorenzo y col., 2000; Spahn y col., 2004).

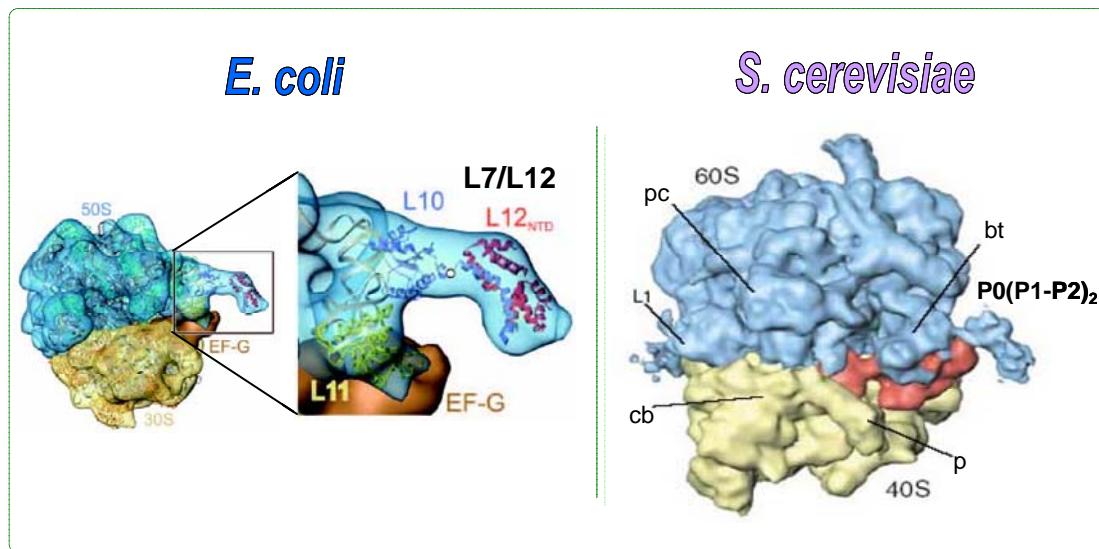


Fig.I.3: Localización del tallo sobre el ribosoma 70S de *E. coli* y sobre el 80S de *S. cerevisiae*. Izquierda: Cristal de la estructura del ribosoma 70S de *E. coli* y el complejo L10-(L12_{DAT})₄ en una imagen de criomicroscopía electrónica de un complejo *E. coli* 70S-EF-G-GDP-ácido fusídico (Diaconu, 2005). Derecha: Modelo de criomicroscopía electrónica del complejo ribosoma 80S de *S. cerevisiae* -EF2-sordarina a una resolución de 11,7 Å. Códigos: p, pico; cb, cabeza; pc, protuberancia central; L1, protuberancia L1; bt, base del tallo (Spahn, 2004).

I.3.3. Función

Ensayos *in vitro* en sistemas bacterianos demostraron que los ribosomas pueden llevar a cabo el proceso de elongación en ausencia de las proteínas ácidas (Glick y Ganoza, 1976; Koteliansky y col., 1977). Estudios posteriores revelaron que en *S. cerevisiae* la síntesis de proteínas tiene lugar en cepas que no expresan las proteínas P1/P2, tanto en ensayos *in vitro* como *in vivo* (Remacha y col., 1995). Estos resultados parecen vinculados con estudios donde se demostró que los tres principales pasos del ciclo de elongación pueden efectuarse sin el empleo de factores de elongación (Gavrilova y col., 1976). Desde entonces los factores de elongación son considerados adquisiciones evolutivas tardías que hacen que la síntesis de proteínas sea más eficiente. Las proteínas ácidas parecen formar parte de este proceso evolutivo y las características que las diferencian del resto de las proteínas ribosómicas, tales como sus propiedades fisicoquímicas y su incorporación tardía al ribosoma en el citoplasma, parecen apoyar esta hipótesis. De esta manera, pueden ser consideradas como unos factores solubles más, que en algún momento de la evolución adquirieron la capacidad de unirse de forma estable al ribosoma para aumentar la eficiencia del sistema.

I.3.3.1. Interacción con los factores de traducción

Desde la década de los 70, varios estudios han sugerido que la proteína L7/L12 está involucrada en interacciones con factores de iniciación, elongación y terminación. A partir de entonces gran cantidad de aproximaciones bioquímicas han proporcionado evidencias de contactos entre la proteína L7/L12 y los factores de traducción. Con el advenimiento de la criomicroscopía electrónica se ha podido obtener imágenes del ribosoma bacteriano en complejo con los factores EF-Tu y el EF-G donde se aprecian contactos entre L7/L12 y estos factores (Stark y col., 1997; Agrawal y col., 1998; Datta y col., 2005). También se obtuvieron imágenes del ribosoma 80S eucariota formando un complejo con el factor EF-2 (homólogo al EF-G de bacterias), en donde se observa a las proteínas del tallo manteniendo un amplio contacto con este factor (Gomez-Lorenzo y col., 2000). Igualmente, un estudio de Resonancia de Superficie de Plasmones demostró una interacción directa del EF-2 con las proteínas P1-P2 en solución (Bargis-Surgey y col., 1999). En conjunto, estos resultados sugieren que existe, entre los diferentes organismos, una conservación funcional del tallo como sitio de interacción de los factores de elongación.

Otra clara evidencia de que la interacción entre los factores de elongación y el tallo está muy conservada, fue aportada por un estudio donde se sustituyó el complejo L11-L10-(L7/L12)₄ de bacterias, por su equivalente eucariota L12-P0-(P1-P2)₂ sobre el ribosoma de *E. coli* (Uchiumi y col., 2002). Este experimento fue posible gracias al hecho de que, como se ha mencionado anteriormente, la región del ARNr a la cual se ancla este complejo está altamente conservada. Los ribosomas híbridos obtenidos fueron activos en ensayos de síntesis de proteínas *in vitro* usando los factores de elongación eucarióticos específicos EF-1A y EF-2 y no los factores EF-Tu y EF-G de bacterias. La discriminación entre factores de diferente naturaleza demuestra que las proteínas del tallo constituyen el sitio de reconocimiento específico para los factores de elongación. Sin embargo, estos resultados no excluyen la posibilidad de que existan otros sitios en el ribosoma que participen en la unión de estos factores.

La relación de las proteínas del tallo con otros factores de traducción también ha sido ampliamente estudiada. Se ha podido observar por criomicroscopía electrónica la interacción entre factores de terminación y el tallo, pero no se demostró un contacto directo de estos factores con L7/L12 (Klaholz y

col., 2003; Rawat y col., 2003). No obstante, muy recientemente se ha demostrado por Resonancia Magnética Nuclear, que L7/L12 en solución establece una interacción directa tanto con los factores EF-Tu y EF-G, como con IF2 y RF3 a través de su extremo carboxilo-terminal. En este estudio se determinó que la unión de cada uno de estos factores se produce en una misma región del DCT de L7/L12 que esta muy conservada (Helgstrand y col., 2007).

Las proteínas ácidas no son los únicos elementos involucrados en la unión de los factores de traducción, pero gran cantidad de datos parecen indicar que debido a su gran flexibilidad, el tallo interviene muy activamente en este proceso modificando su conformación para ajustarse al conjunto de factores con los que interacciona. De hecho se ha propuesto que el tallo actúa como un interruptor molecular durante la traducción (fig. I.4), alternando conformaciones de "abierto" y "cerrado", relacionadas con el reclutamiento de los factores solubles del citoplasma y con la estimulación de la actividad GTPasa de éstos una vez unidos al ribosoma (Bocharov y col., 2004).

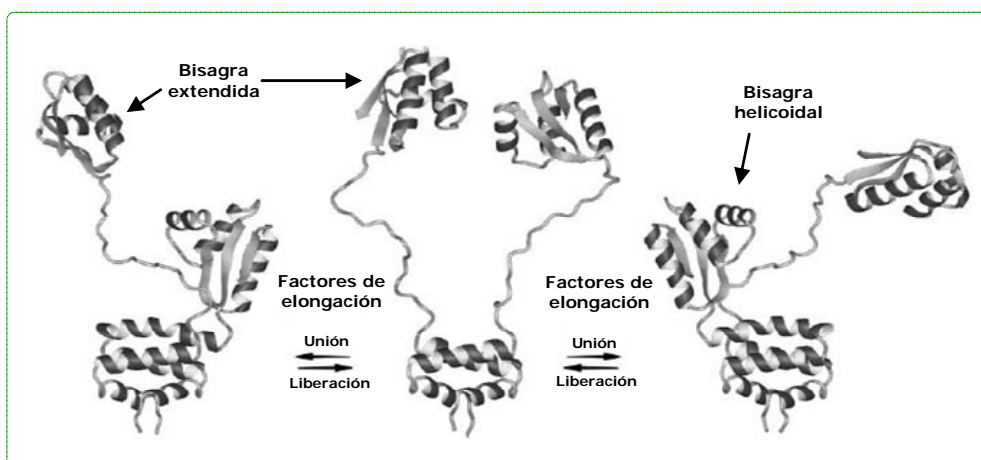


Fig.I.4: Modelo "Interruptor molecular" de la región bisagra del dímero L7/L12. Los monómeros del dímero L7/L12 pueden alternar entre los estados de bisagra helicoidal y bisagra extendida en respuesta a las condiciones del medio para enganchar o liberar los factores solubles durante el proceso de traducción del ribosoma (Bocharov, 2004)

La gran flexibilidad del tallo se debe a la composición de aminoácidos de la región central o bisagra de las proteínas ácidas. Este dominio es indispensable para la función de las proteínas ácidas (Gudkov y col., 1991). Otras pruebas de la gran flexibilidad del tallo fueron aportadas por estudios de entrecruzamiento químico, que han demostrado que L7/L12 establece contactos con las proteínas L10 y L11 (Zecherle y col., 1992), y que interacciona más débilmente con L5 y la

distante L2 de la subunidad 50S, así como también con S2, S3, S7, S14 y S18 de la subunidad 30S (Dey y col., 1998). Estos resultados fueron corroborados por imágenes del DCT de L7/L12 sobre la partícula 70S obtenidas por criomicroscopía electrónica; dicho dominio fue observado en cuatro posiciones diferentes de acuerdo con los resultados del entrecruzamiento (Montesano-Roditis y col., 2001). Esas posiciones no fueron observadas al mismo tiempo, lo que concuerda con el dinámico papel que ha sido postulado para las proteínas ácidas durante la traducción.

I.3.3.2. Papel en la actividad GTPasa vinculada al tallo ribosómico

Además de intervenir activamente en la unión de los factores de traducción al ribosoma, se ha propuesto que las proteínas ácidas participan en la estimulación de la actividad de hidrólisis de GTP que llevan a cabo los factores de elongación. Los factores de elongación tienen una actividad intrínseca de hidrólisis del GTP, pero es muy baja en ausencia de la subunidad mayor del ribosoma (Andersen y col., 2003). Los resultados de varios estudios han demostrado que en ribosomas que carecen de la proteína L7/L12, la actividad de hidrólisis de EF-G y EF-Tu sobre el GTP está severamente afectada, efecto que revierte notablemente cuando se añade la proteína purificada (Kischa y col., 1971; Weissbach y col., 1972). Ensayos cinéticos y experimentos de mutagénesis también indican que L7/L12 está involucrada en esta actividad (Mohr y col., 2000; Savelsbergh y col., 2000). Un estudio reciente sugiere que L7/L12 facilita la hidrólisis de GTP estabilizando la conformación activa de los factores de elongación, y descarta la hipótesis de que esta proteína tenga en su secuencia residuos involucrados en la catálisis; según los autores, estos resultados sitúan a la L7/L12 como el tercer elemento ribosómico importante para la hidrólisis de GTP (Diaconu y col., 2005). Por otro lado, en eucariotas se ha propuesto que las proteínas P pueden estar involucradas en la actividad GTPasa del EF-2 durante la translocación (Sanchez-Madrid y col., 1979).

I.3.3.3. Otras funciones

Algunos estudios señalan que las proteínas del tallo eucariótico parecen llevar a cabo funciones adicionales a las desempeñadas durante la síntesis de proteínas. Las proteínas P se han visto asociadas a enfermedades relacionadas

con el sistema inmune (Elkon y col., 1985; Kurup y Banerjee, 2000; Kaplan 1997), y parecen haber evidencias de que están involucradas en el proceso de transcripción y de reparación del ADN (Ito y col., 2001).

I.4. EL TALLO RIBOSÓMICO DE *Saccharomyces cerevisiae*

La levadura *Saccharomyces cerevisiae* ha sido un buen modelo para estudios biológicos debido a una serie de ventajas como su facilidad de cultivo, su velocidad de división celular y principalmente debido a su fácil manipulación genética. Estas características han permitido, mediante la utilización de técnicas de biología molecular, realizar importantes estudios sobre la estructura y función del ribosoma, de los cuales se ha obtenido una valiosa información que sirve de referencia para organismos eucariotas superiores.

El tallo de *S. cerevisiae* está compuesto por la proteína P0 y por cuatro proteínas ácidas, dos de tipo P1: P1 α y P1 β , y dos de tipo P2: P2 α y P2 β . Estas proteínas presentan ciertas características que sugieren que han evolucionado a una estructura más sofisticada capaz de desempeñar funciones adicionales a la de interaccionar con los factores de traducción (Ballesta y Remacha, 1996).

I.4.1. La Proteína P0: función y estructura

La proteína P0 de *S. cerevisiae* tiene un tamaño de 32 kDa, una longitud de 312 aminoácidos y un pI teórico de 4,56. Se han descrito tres dominios funcionales para esta proteína. Los primeros 121 aminoácidos constituyen el DAT, responsable de la unión de P0 al ARNr 26S (Santos y Ballesta, 2005). El segundo dominio comprende aproximadamente los aminoácidos 118-138, región que parece estar involucrada en la interacción con el EF-2 y esta asociada con la resistencia a derivados antifúngicos de la sordarina (Santos y col., 2004). Por último el dominio carboxilo, se ha descrito como una prolongación ausente en L10, que tiene una elevadísima homología con el DCT de las proteínas P1-P2, especialmente la secuencia consenso DMGFGLFD. Este dominio constituye la región mínima necesaria para llevar a cabo el proceso de traducción (Santos y Ballesta, 1995) y es responsable de la viabilidad celular en ausencia de las proteínas ácidas (Remacha y col., 1995). El DCT tiene la capacidad de interaccionar con los factores EF-1a y EF-2 y también es el sitio de unión de las

proteínas ácidas (Vard y col., 1997; Lalioti y col., 2002; Perez-Fernandez y col., 2005; Krokowski y col., 2006). A diferencia de las proteínas P1-P2, P0 es una proteína esencial y no se encuentra libre en el citoplasma (Santos y Ballesta, 1994), aunque en mamíferos un complejo de P0 con las proteínas P1 y P2 se ha detectado en el citoplasma (Rich y Steitz, 1987).

I.4.2. Las Proteínas Ácidas

I.4.2.1. Características generales

En *S. cerevisiae* las proteínas ácidas tienen un tamaño promedio de 12 kDa, y un pI teórico de entre 3 y 4. Presentan una homología de secuencia del 60%, siendo mayor entre las del mismo tipo: 77,1% entre P1 α y P1 β , y un 80,2% entre P2 α y P2 β . Se conoce poco sobre la estructura de estas proteínas, si bien se ha podido determinar que la proteína P2 β en solución es muy flexible y tiene características de glóbulo fundido (Zurdo y col., 1997). Por otro lado, la proteína P1 α también exhibe gran flexibilidad, pero su nivel de estructuración es menor que la de P2 β (Zurdo y col., 2000a; Tchorzewski y col., 2003). Un estudio reciente de la estructura del complejo P1 α -P2 β realizado mediante RMN y dispersión de rayos X de pequeño ángulo (*SAXS: small-angle X-ray scattering*), ha revelado que este complejo tiene una forma alargada (Grela y col., 2007) y que las regiones estructuradas del complejo P1 α -P2 β involucran α -hélices que pueden estar dispuestas en una topología paralela o antiparalela.

I.4.2.2. Asociación de las proteínas P1 y P2 al tallo.

Se ha determinado que cada una de las proteínas ácidas se encuentra en cantidades equivalentes en la población global de ribosomas (Remacha y col., 1992), existiendo sólo cuatro proteínas por tallo ribosómico (Saenz-Robles y col., 1990), una copia de cada uno de los subtipos P1 α , P1 β , P2 α y P2 β (Guarinos y col., 2003).

Los resultados de varios estudios parecen indicar que la asociación de estas proteínas al ribosoma se produce en forma de heterodímeros. Un estudio donde se obtuvieron cepas mutantes de *S. cerevisiae*, en las cuales se interrumpieron sólo dos de los genes de las proteínas ácidas, mostró que en el ribosoma se producen

dos situaciones muy diferentes que dependen de la combinación de los genes interrumpidos. En aquellas cepas donde se interrumpieron dos genes de proteínas de distinto tipo (P1/P2), se encontró que el par de proteínas que se expresa se une al ribosoma. Por el contrario, cuando se interrumpen simultáneamente los genes del mismo grupo de proteínas, bien P1 α /P1 β ó P2 α /P2 β , las proteínas no interrumpidas no se unen al ribosoma (Remacha y col., 1992). Estos resultados indican que hace falta al menos una proteína de cada grupo (P1/P2) para que puedan unirse al ribosoma, sugiriendo que pueden producirse interacciones entre proteínas de diferente tipo. Adicionalmente se encontró que en ausencia de proteínas P1 (cepa D67), las proteínas P2 permanecen libres en el citoplasma, mientras que en cepas que carecen de proteínas P2 (cepa D45), las proteínas P1 son rápidamente degradadas y apenas se detectan en la célula. Se ha descrito que las proteínas P2 ejercen un efecto protector sobre las P1 evitando su degradación, y dicha protección es específica de un subtipo sobre otro; así P1 β es protegida únicamente por P2 α y no por P2 β (Nusspaumer y col., 2000). Cuando las cepas D45 y D67 son transformadas con un vector que expresa alguno de los genes que tienen interrumpidos, en el ribosoma son detectadas proteínas ácidas (Remacha y col. 1992). En el caso de la cepa D45, si ésta es transformada con un plásmido que exprese alguna de las proteínas de tipo P2 (P2 α o P2 β), en el ribosoma se detectan proteínas de tipo P1 y la proteína de tipo P2 expresada desde el plásmido. Por otro lado, si la cepa D67 se transforma con un vector que expresa alguna proteína de tipo P1, bien P1 α o P1 β , se unirán al ribosoma las proteínas P2 y la proteína P1 expresada desde el vector.

Otro estudio señala que cuando P1 α interacciona con P2 β en solución, el nivel de estructuración de ambas proteínas aumenta (Zurdo y col., 2000a). De todos estos resultados se deduce que se producen interacciones específicas entre los subtipos de las proteínas ácidas. Resultados de experimentos con proteínas P0 quiméricas igualmente señalan la existencia de interacciones preferentes entre P1 α -P2 β y P1 β -P2 α (Guarinos y col., 2001). Estas interacciones han sido estudiadas también por ensayos de doble híbrido, y los resultados han corroborado que se producen fuertes interacciones entre P1 α -P2 β y P1 β -P2 α (Lalioy y col., 2002; Tchorzewski y col., 2003). A pesar de existir todas estas evidencias de interacciones específicas entre las proteínas ácidas, lo correcto es referirse a ellas como preferentes, ya que en mutantes donde se han interrumpido los genes del par P1 α -P2 α ó P1 β -P2 β , los heterodímeros que se expresan también

tienen la capacidad de unirse al ribosoma y su tiempo de generación no varía mucho con respecto a las cepas que contienen los pares preferentes (Remacha y col., 1992).

La unión de las proteínas ácidas al ribosoma se ha descrito como un proceso coordinado, en el cual las proteínas P1 interaccionan con P0 y a su vez sirven de anclaje para las proteínas P2. Estudios *in vitro* han mostrado que la proteína P1 α puede unirse al ribosoma en ausencia del resto de las proteínas ácidas, mientras que P2 β es incapaz de hacerlo sin la presencia de P1 α (Zurdo y col., 2000b), de acuerdo con los resultados *in vivo* (Remacha y col., 1992). Estos resultados sugieren que no existe un sitio de unión para las proteínas P2 en la proteína P0, y que éstas se unen en complejo a través de las proteínas P1. Los resultados de un estudio reciente indican que P0 presenta dos sitios de unión independientes para los heterodímeros de P1/P2, la región comprendida entre los aminoácidos 199-230 para el complejo P1 α -P2 β y las posiciones 231-258 como sitio de unión del heterodímero P1 β -P2 α (Krokowski y col., 2006). El DAT de las proteínas P1 y P2 es el responsable de la interacción con el ribosoma (Jose y col., 1995).

I.4.2.3. Función

Las funciones de las proteínas ácidas descritas en el apartado I.3.3. afectan tanto a las procariotas como a las eucariotas, pero como se ha señalado anteriormente, el hecho de que en eucariotas existan dos tipos de proteínas diferentes, P1 y P2, sugiere que éstas pueden estar involucradas en otro tipo de funciones. Muchos de los resultados obtenidos en estudios realizados con las proteínas ácidas del tallo de *S. cerevisiae* parecen indicar que el tallo eucariótico además de participar en la interacción con los factores de traducción, ha evolucionado para desempeñar un rol adicional que está relacionado con la regulación de la traducción, en donde las proteínas que lo conforman actúan como factores que modulan la eficiencia de traducción (Ballesta y Remacha, 1996).

I.4.2.3.1. Papel de la fosforilación de las proteínas ácidas

En *S. cerevisiae* las proteínas ácidas están monofosforiladas en la serina del DCT cuando están unidas al tallo ribosómico (Zinker y Warner, 1976; Vidales y

col., 1984). Sin embargo, la sustitución por mutagénesis dirigida de esta serina por otro aminoácido, no altera la unión de estas proteínas al ribosoma *in vivo*, ni la eficiencia de traducción (Zambrano y col., 1997; Rodríguez-Gabriel y col., 1998). Otros estudios han determinado que la fosforilación de la serina del DCT de P1 β esta relacionada con la estabilidad de la proteína, y se ha postulado que puede formar parte de la señal de degradación (Nusspaumer y col., 2000). Por otro lado, parece que la incorporación de un fosfato en la secuencia de la proteína P1 α impide la formación del heterodímero P1 α -P2 β , lo que posiblemente se deba al aumento de la inestabilidad de este heterocomplejo (Tchorzewski y col., 2000). Algunos resultados sugieren que la fosforilación de las proteínas ácidas puede modificar la expresión de algunos ARNm, y por tanto la naturaleza de las proteínas sintetizadas (Remacha y col., 1995).

I.4.2.3.2. Efectos en la célula de la disrupción de las proteínas ácidas

Las cuatro proteínas ácidas del tallo ribosómico de *S. cerevisiae*, P1 α , P1 β , P2 α y P2 β , son codificadas por genes independientes. La disrupción desde uno a los cuatro genes de estas proteínas, demostró que no son esenciales (Remacha y col., 1990). Se obtuvieron cepas con disrupciones simples, cuádruples, y todas las combinaciones de dobles y triples. En todos los casos los mutantes son viables, aunque se produce un aumento del tiempo de duplicación, que varía según que proteína o proteínas falten (Remacha y col., 1990; Remacha y col., 1992; Remacha y col., 1995). El análisis de mutantes simples mostró que no existen grandes diferencias fenotípicas con relación a la cepa silvestre.

En el caso de los dobles disruptantes, como ya se ha expuesto, en las cepas D67 y D45 no se detectan proteínas ácidas en el ribosoma mientras que en las cepas que tienen el resto de combinaciones de interrupciones dobles las proteínas presentes si se unen a la partícula ribosómica; en estas últimas no se observan notables cambios fenotípicos, mientras que las primeras sufren un incremento considerable del tiempo de generación. Las cepas triple y cuádruple mutantes muestran un fenotipo muy similar al de las cepas D45 y D67. En estas cepas donde no hay proteínas ácidas en el ribosoma, el tiempo de generación se triplica, el crecimiento es sensible a temperatura y las células diploides no esporulan (Remacha y col., 1995). En relación con la cepa silvestre la eficiencia de la traducción en estos mutantes disminuye sensiblemente, y por tanto la cantidad

total de proteínas sintetizadas; sin embargo, ni la capacidad de suprimir codones sin sentido *in vivo* ni la fidelidad de la traducción están alteradas. En estas cepas también se produce un cambio en el patrón de las proteínas sintetizadas; en geles bidimensionales se observa un incremento en la cantidad de un pequeño número de proteínas y aparecen proteínas de nueva síntesis que, por su posición, pueden ser proteínas de choque térmico (Remacha y col., 1992; Remacha y col., 1995).

Como se ha expuesto, el efecto de la ausencia de cada una de las proteínas es distinto, y dicho efecto no se suprime por la sobreexpresión de una de las otras. Estos resultados indican por tanto, que cada una de las proteínas de los dos grupos tiene una función distinta y específica dentro del tallo (Remacha y col., 1990; Remacha y col., 1992; Remacha y col., 1995).

Por otro lado, resultados de experimentos *in vivo* indican que la cantidad de proteínas ácidas presente en los ribosomas varía en función del estado metabólico de la célula. Se ha observado que en células en fase estacionaria los ribosomas carecen de proteínas P1/P2 (Saenz-Robles y col., 1990). Estos datos apoyan un modelo de traducción diferencial modulado por la presencia de las proteínas P1/P2 en el ribosoma (Ballesta y Remacha, 1996).

I.4.2.3.3. Reactividad diferencial de las proteínas ácidas

Las proteínas P1/P2 modulan la actividad del tallo ribosómico y desempeñan funciones diferentes (Zurdo y col., 2000a). Experimentos de entrecruzamiento químico en los que se introdujo una cisteína en el extremo carboxilo de las cuatro proteínas ácidas, muestran que las proteínas de tipo P2 reaccionan con un mayor número de proteínas ribosómicas que las de tipo P1. Además, el número y la cantidad de proteínas con las que reaccionan las proteínas de tipo P2 es mayor en P2 β que en P2 α , indicando que sus extremos carboxilo alcanzan regiones que se solapan pero no son idénticas (Qiu y col., 2006). Esto puede deberse a que el dominio carboxilo de las proteínas ácidas presentan distinta movilidad, y por tanto podrían desempeñar diferentes funciones.

En conjunto, los resultados de todos estos estudios demuestran que existe una clara especialización entre las familias de las proteínas ácidas, lo cual proporciona una elevada complejidad de regulación y por tanto de acción. Es

probable que durante la evolución cada uno de los componentes del tallo fueron diferenciándose, adquiriendo una estructura permanente y una función específica que inicialmente podía ser desempeñada indistintamente por cualquiera de ellos.

A pesar de la información de la que se dispone hasta el momento, aun queda por conocer algunos aspectos sobre la función específica de cada una de estas proteínas, así como de las relaciones existentes entre ellas. El conocimiento en detalle de estos componentes ayudará a comprender el funcionamiento del mecanismo de regulación que ha sido propuesto para el tallo ribosómico.

Objetivos

II. OBJETIVOS DEL TRABAJO

El objetivo del presente trabajo de investigación es identificar los dominios de las proteínas P1 y P2 de *Saccharomyces cerevisiae* responsables de su especificidad funcional y estructural. Para la consecución de este objetivo general, se establecieron los siguientes objetivos específicos:

- Delimitar el sitio de unión al ribosoma en las proteínas de tipo P1 y en las de tipo P2.
- Delimitar el sitio de interacción entre las proteínas de tipo P1 y las de tipo P2.
- Analizar si existen diferencias funcionales entre los dominios carboxilo-terminales de las proteínas P1 y P2.

Resultados

III.1. CONSTRUCCIÓN DE PROTEÍNAS QUIMÉRICAS. INTERCAMBIO DE LAS REGIONES AMINO-TERMINALES ENTRE P1 α Y P2 β .

Como se ha expuesto anteriormente, a pesar de su elevada homología estructural, las proteínas ácidas de *S. cerevisiae* parecen desempeñar funciones diferentes. Estas diferencias son más evidentes entre proteínas de distinto tipo (P1 y P2). En este trabajo nos planteamos identificar qué región de las proteínas P1 y P2 es la responsable de la especificidad estructural y funcional de cada proteína. Para tal fin, se planteó realizar un intercambio de diferentes fragmentos de la región amino-terminal entre una proteína de tipo P1 y una de tipo P2. Los genes quimera resultantes de este intercambio fueron expresados en las cepas de *S. cerevisiae* adecuadas con objeto de estudiar qué región de estas proteínas interviene en la unión al ribosoma y en la interacción que se produce entre ellas. Adicionalmente, esta aproximación permite explorar si existe o no redundancia funcional entre los dominios carboxilos de las proteínas P1 y P2.

Para este estudio se decidió trabajar con el par P1 α -P2 β debido a que estas proteínas se asocian preferentemente y existe complementación funcional entre ellas (ver apartado I.4.2.2). Además, el complejo P1 α -P2 β tiene un efecto mucho más acusado sobre la actividad traduccional que el que tiene el complejo P1 β -P2 α , lo que indica que el par P1 α -P2 β cumple un papel más importante en la función del tallo que la que desempeña el heterodímero P1 β -P2 α (Krokowski, y col., 2006).

Las regiones del dominio amino-terminal a intercambiar entre las proteínas P1 α y P2 β se seleccionaron a partir de la estructura secundaria con la finalidad de minimizar los cambios estructurales. En la figura III.1 se muestra la predicción de la estructura secundaria de las proteínas P1 α y P2 β obtenida con el programa PSIPRED (McGuffin y col., 2000), donde se puede observar que la estructura de ambas proteínas consiste en una sucesión de α -hélices separadas por regiones con poca estructura. Las regiones amino-terminales (aproximadamente los primeros 60 aminoácidos) de la proteína P1 α y de la proteína P2 β presentan una estructura muy similar pero no idéntica.

(serina 96 en el caso de la proteína P1 α y serina 100 en la proteína P2 β) (Qiu, 2004).

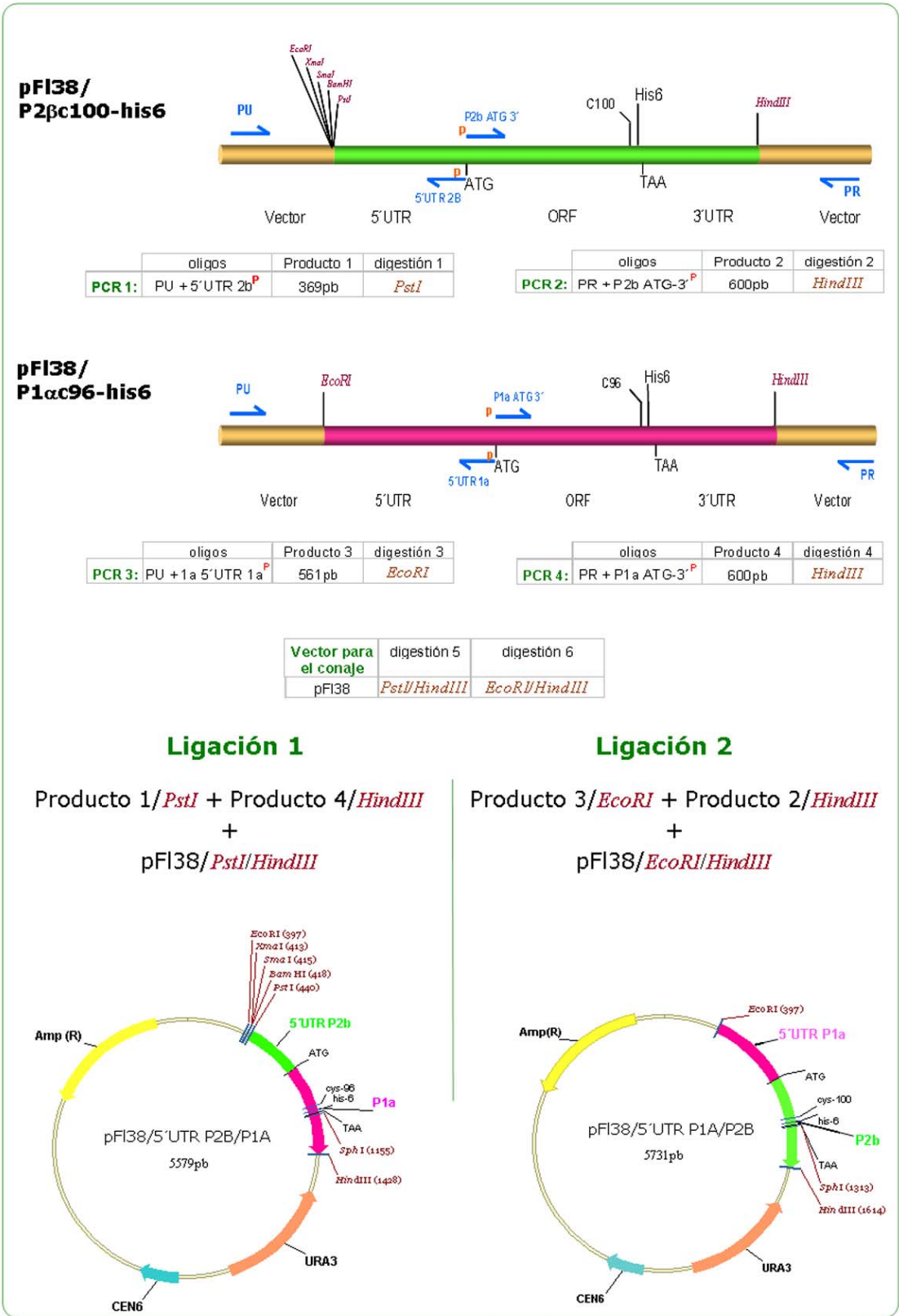


Fig. III.2: Esquema de la construcción de los genes 5'UTRP1 α /P2 β y 5'UTRP2 β /P1 α .

La expresión de las proteínas quiméricas con estas modificaciones se hizo para disponer de un epítipo (6-his) con el cual reconocer a estas proteínas en ensayos de *Western* y para poder realizar futuros experimentos de entrecruzamiento químico mediante la inducción de la formación de puentes disulfuro, a través de los residuos de cisteína. Ninguna de estas modificaciones afecta la función de estas proteínas en el ribosoma (Qiu, 2004).

Los vectores que expresan los genes con la región reguladora 5'UTR intercambiada, que tienen una cola de 6 histidinas y la serina fosforilable mutada a cisteína (fig. III.2), se utilizaron como molde en todas las amplificaciones posteriores realizadas para construir los genes quiméricos de cada serie (fig. III.3 y III.4); por tanto, aunque no se especifica en la nomenclatura utilizada en este trabajo, todas las proteínas quiméricas portan las citadas modificaciones.

La construcción de los genes quiméricos de la serie P2B/P1A se hizo amplificando por PCR dos fragmentos que fueron clonados en un vector pFI38. El primer fragmento comprende la región reguladora 5'UTR del gen RPP2B y una parte de la ORF del gen RPP1A, cuya extensión varía dependiendo de la quimera construida. El segundo fragmento consta de una parte de la ORF del gen RPP2B cuyo tamaño varía en función de la quimera, e incluye la región 3'UTR.

En la figura III.3 se esquematiza la construcción del gen 49aaP1A/P2B que codifica la proteína quimérica 49aaP1 α /P2 β . La estrategia que se expone en dicha figura es la que se siguió para construir todos los genes quiméricos de la serie P1A/P2B, utilizando en cada caso oligonucleótidos específicos (tabla VI.5.). Los genes molde y la combinación de cebadores utilizada en cada reacción de PCR se especifica en la tabla VI.9.

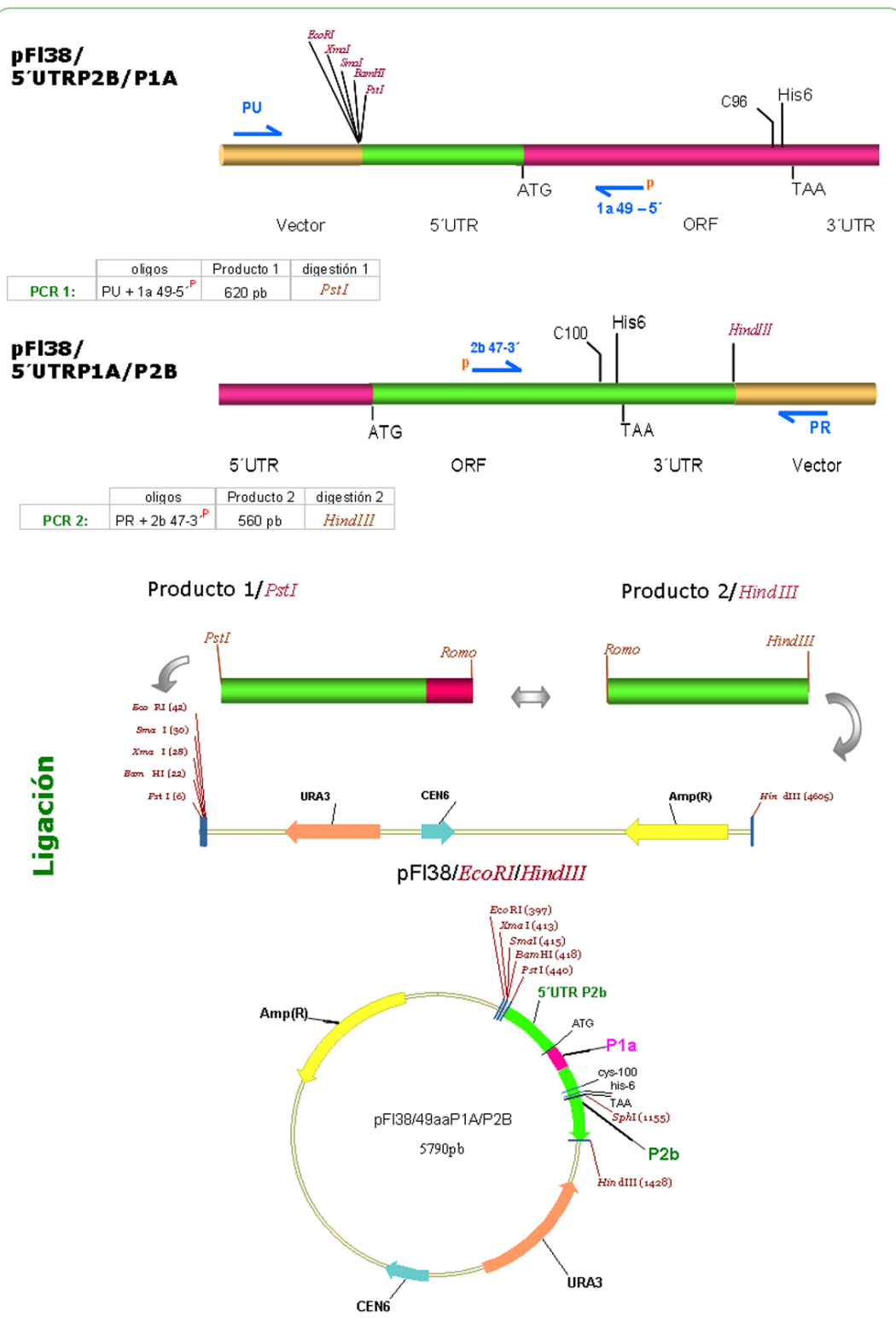


Fig. III.3: Esquema de la construcción del gen quimérico 49aaP1A/P2B. Todos los genes quiméricos de la serie P1A/P2B se construyeron siguiendo los pasos que se esquematizan en esta figura.

La composición de la región amino-terminal de las proteínas quiméricas de la serie P1 α /P2 β se representa en la figura III.4, donde se pueden observar los fragmentos de la proteína P1 α reemplazados en la proteína P2 β .

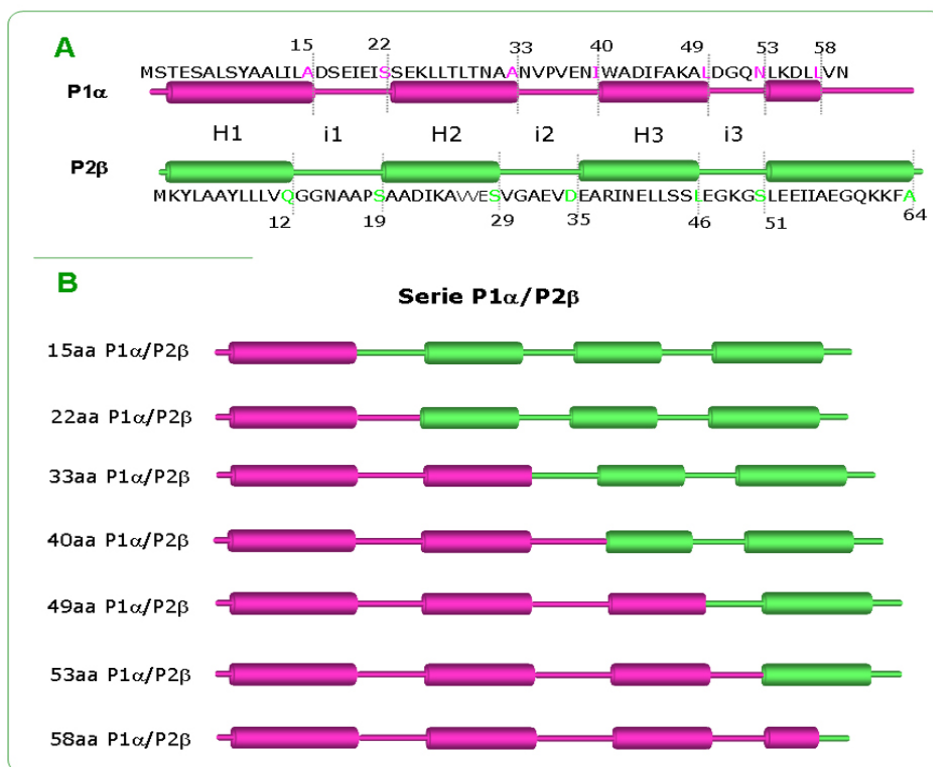


Fig. III.4: **A:** Estructura secundaria de la región amino-terminal de las proteínas P1 α y P2 β basada en la predicción hecha con el PSIPRED. Se señalan con líneas perpendiculares las regiones intercambiadas entre las proteínas P1 α y P2 β , y se indica el número de aminoácidos en cada caso. **B:** Representación gráfica de la región amino-terminal de las proteínas quiméricas de la serie P1 α /P2 β .

De la misma manera que para la serie P1A/P2B, en la construcción de los genes quiméricos de la serie P2B/P1A se amplificaron por PCR dos fragmentos que posteriormente se insertaron en un vector pFI38. En esta serie, el primer fragmento incluye la región reguladora 5'UTR del gen RPP1A y una parte de la ORF del gen RPP2B. El segundo fragmento comprende una parte de la ORF del gen RPP1A e incluye la región 3'UTR de este gen. El tamaño de las regiones de las ORF de los genes RPP2B y RPP1A amplificadas varía según la quimera construida. La construcción de todos los genes quiméricos de la serie P2B/P1A se hizo siguiendo los pasos que se describen en la figura III.5, donde se esquematiza la construcción del gen híbrido 46aaP2B/P1A que codifica la proteína quimérica 46aaP2 β /P1 α . Los oligonucleótidos específicos que se utilizaron para la construcción de todos los genes quiméricos de la serie P2B/P1A se relacionan en la

tabla VI.6, y en la tabla VI.10 se especifica la combinación de los cebadores y moldes utilizados en cada reacción de PCR.

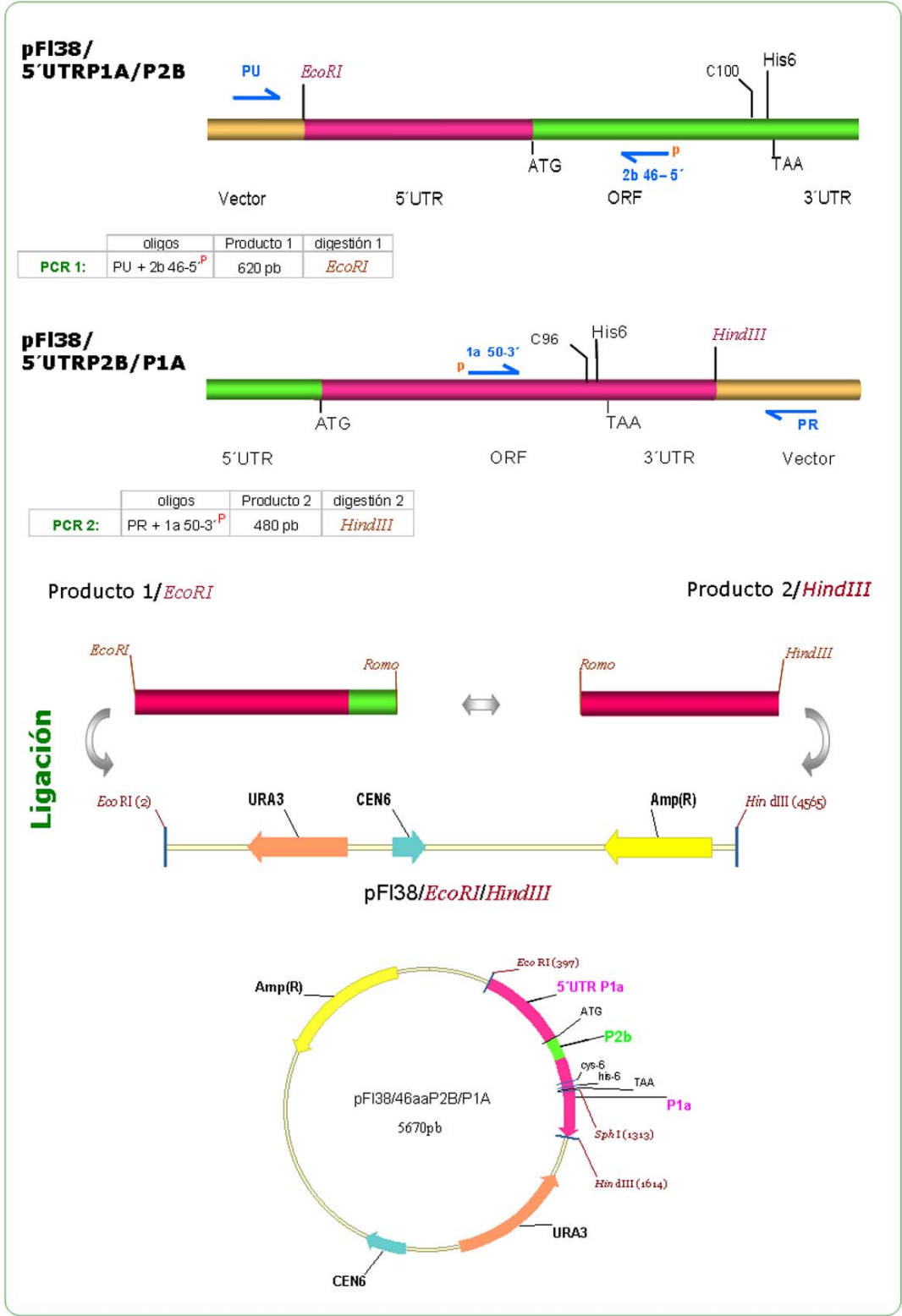


Fig. III.5: Esquema de la construcción del gen quimérico 46aaP2B/P1A. Todos los genes quiméricos de la serie P2B/P1A se construyeron siguiendo los pasos que se esquematizan en esta figura.

La composición de la región amino-terminal de las proteínas quiméricas de la serie P2 β /P1 α se representa en la figura III.6, donde se observan los fragmentos de la proteína P2 β reemplazados en la proteína P1 α .

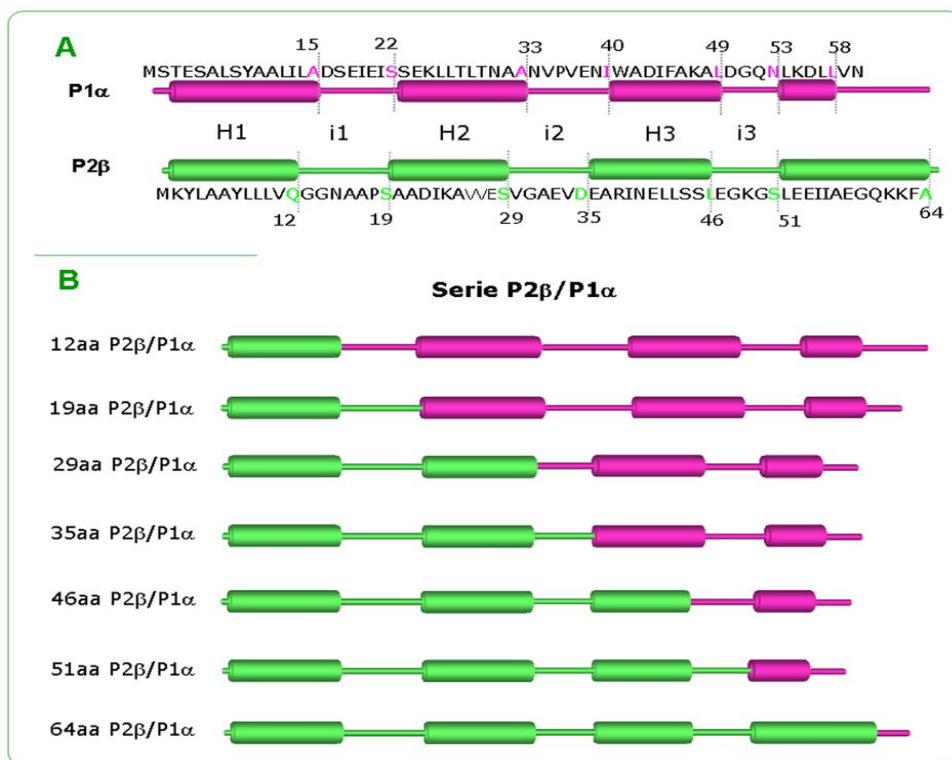


Fig. III.6: **A:** Estructura secundaria de la región amino-terminal de las proteínas P1 α y P2 β basada en la predicción hecha con el PSIPRED. Se señalan con líneas perpendiculares las regiones intercambiadas entre las proteínas P1 α y P2 β , y se indica el número de aminoácidos en cada caso. **B:** Representación gráfica de la región amino-terminal de las proteínas quiméricas de la serie P2 β /P1 α .

III.2. DETERMINACIÓN DEL SITIO DE UNIÓN AL RIBOSOMA EN LAS PROTEÍNAS P1 α Y P2 β .

Estudios previos han indicado que las proteínas P1 y P2 se unen al tallo ribosómico por el extremo amino-terminal (Jose y col., 1995; Gonzalo y col., 2001; Naganuma y col., 2007). No obstante, la secuencia de aminoácidos que interviene en esta unión no se ha precisado.

Con el objeto de definir la región mínima responsable de la identidad de cada proteína que le permite unirse al sitio que le corresponde en el ribosoma, se estudió la capacidad de unión al ribosoma de levadura de las proteínas quiméricas

P1 α /P2 β y P2 β /P1 α construidas en este trabajo. Para ello distintas cepas de levadura disruptantes en genes que codifican las proteínas ácidas se transformaron con los plásmidos portadores de los genes quiméricos de las series P1A/P2B y P2B/P1A. En cada caso se escogieron aquellas cepas carentes de la proteína ácida cuya unión al ribosoma se pretendió estudiar, de esta manera se evita que se establezca una competencia de unión al tallo con la proteína endógena.

III.2.1. Estudio de la unión al ribosoma de las proteínas quiméricas en cepas de levadura carentes de una proteína ácida.

III.2.1.1. Estudio de las proteínas de la serie P1 α /P2 β .

Para definir qué región del extremo amino-terminal de P1 α es la responsable de que esta proteína pueda unirse al sitio que le corresponde en el ribosoma, se utilizó la cepa de levadura D7 que tiene el gen de la proteína P1 α interrumpido. Esta cepa se transformó con cada uno de los genes quiméricos de la serie pFI38/P1A/P2B y como control se utilizó el gen de la proteína P1 α c96his6 clonado en el vector pFI38. Las cepas transformadas se crecieron en el medio de cultivo SC-URA, las células se recolectaron en fase exponencial de crecimiento y se prepararon extractos totales S30, ribosomas crudos (80S), y una fracción de ribosomas purificados obtenida tras someter a la fracción anterior a un lavado en condiciones de alta sal en un gradiente discontinuo de sacarosa (80S L) (apartado VI.9.2.) con la finalidad de eliminar proteínas que no están unidas firmemente al ribosoma. Estas fracciones celulares se resolvieron en geles SDS-PAGE y posteriormente se analizaron mediante ensayos de *Western*, utilizando un anticuerpo comercial anti-histidinas y como monitor de la proteína total cargada se utilizó la proteína P0 detectada con el anticuerpo 3BH5.

Los resultados obtenidos del análisis del extracto total S30 muestran que todas las proteínas quiméricas, a excepción de la proteína 15aaP1 α /P2 β , se expresan adecuadamente en la célula (fig. III.7).

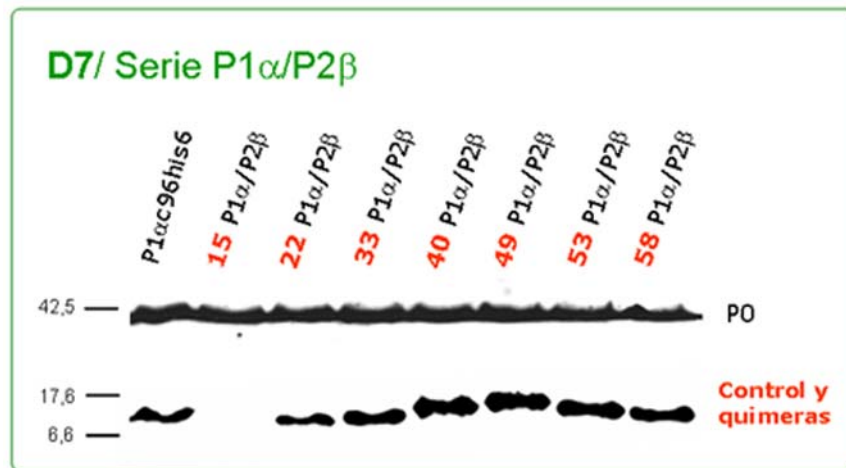


Fig. III.7: Análisis de *Western* de extractos S30 de la cepa D7 transformada con cada una de las construcciones de la serie pFI38/P1A/P2B y el control pFI38/P1α96his6. Se resolvieron 80μg de extracto S30 en geles de SDS-PAGE 15%. Todas las proteínas quiméricas y el control se detectaron con un anticuerpo anti-histidina comercial y la proteína P0 que se utilizó como control de carga de proteína total, fue detectada con el anticuerpo 3BH5.

La ausencia de la proteína 15aaP1α/P2β en el extracto S30 puede deberse a defectos a nivel de transcripción o bien a que esta proteína quimérica sea susceptible de degradación. Para determinar si el gen que codifica la proteína 15aaP1α/P2β se transcribe correctamente se realizó un ensayo de *Northern* con ARN total purificado a partir de las cepas D7/15aaP1α/P2β, de la cepa silvestre W303, y de la cepa D7 sin transformar y transformada con dos plásmidos de la serie pFI38/P1A/P2B (fig. III.8).

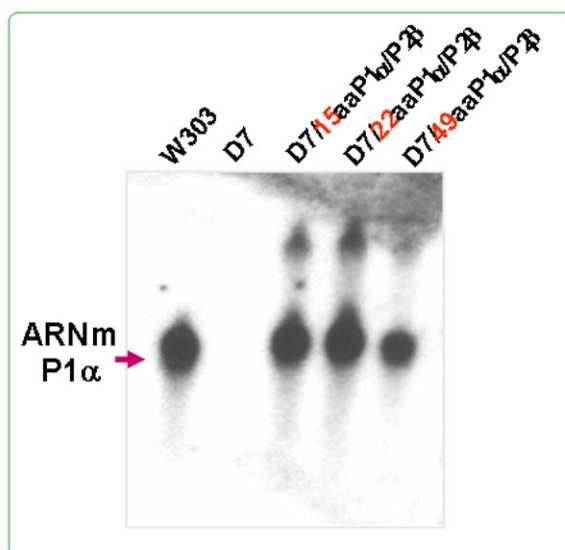


Fig. III.8: Análisis de *Northern* del ARNm de la proteína quimérica 15aaP1α/P2β. Se resolvieron 20 μg de ARN total de las cepas W303, D7, D7/pFI38/15aaP1A/P2B, D7/pFI38/22aaP1A/P2B y D7/pFI38/49aaP1A/P2B en un gel de agarosa desnaturalizante. Como sonda se utilizó un oligonucleótido que hibrida con los primeros 45 nucleótidos de la ORF del gen RPP1A que codifica la proteína P1α.

En el ensayo de *Northern*, el ARN mensajero de P1α se detectó en todos los casos menos en el mutante D7, como era de esperar (fig. III.8). Estos datos

descartan que la ausencia de la proteína 15aaP1 α /P2 β en el extracto total S30 se deba a que se produce una regulación transcripcional o que el transcrito se degrade. Por tanto, es muy probable que se trate de un proceso de degradación proteica.

En el análisis mediante *Western* de los ribosomas crudos (80S) de las cepas D7 que expresan los genes de las proteínas quiméricas de la serie P1A/P2B, se aprecia claramente que sólo se unen al ribosoma las proteínas quiméricas 40aaP1 α /P2 β , 49aaP1 α /P2 β , 53aaP1 α /P2 β y 58aaP1 α /P2 β .

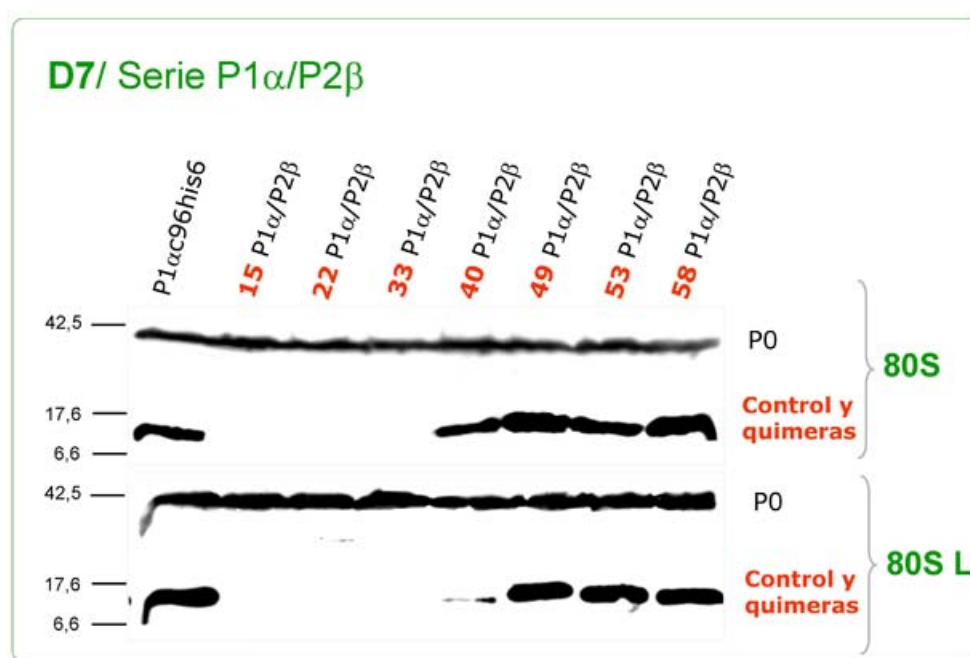


Fig. III.9: Análisis de *Western* de ribosomas crudos (80S) y ribosomas lavados (80S L) de la cepa D7 transformada con cada una de las construcciones de la serie pFI38/P1A/P2B y el control pFI38/P1ac96his6. Se resolvieron 20 μ g de ribosomas crudos y lavados en geles de SDS-PAGE 15%. Todas las proteínas quiméricas y el control se detectaron con un anticuerpo anti-histidina comercial y la proteína P0 que se utilizó como control de carga de proteína total, fue detectada con el anticuerpo 3BH5.

En la fracción de ribosomas purificados (80S L) igualmente se observa la presencia de estas cuatro proteínas quiméricas. No obstante, la cantidad de la proteína 40aaP1 α /P2 β que se detecta en esta fracción es menor que la detectada en ribosomas crudos, lo que indica que la interacción de esta proteína con el ribosoma es lábil, a diferencia de las proteínas 49aaP1 α /P2 β , 53aaP1 α /P2 β y 58aaP1 α /P2 β que se mantienen fuertemente unidas a la partícula ribosómica (fig. III.9). Estos resultados indican que para que se produzca una interacción estable de la proteína P1 α con el tallo ribosómico, se requiere una región que incluya al

menos las α -hélices H1, H2 y H3 del extremo amino-terminal de P1 α (proteína 49aaP1 α /P2 β).

Con el fin de determinar si la presencia de las proteínas quiméricas en el ribosoma interfiere con la unión de las proteínas ácidas endógenas, se analizaron mediante la técnica de isoelectroenfoque los ribosomas purificados de las cepas en donde las quimeras se unen a la partícula ribosómica. Debido a que cada proteína ácida tiene un pI diferente, mediante la técnica de isoelectroenfoque se pueden analizar todas las proteínas ácidas presentes en el ribosoma simultánea e individualmente. Los ribosomas de la cepa silvestre W303 son incluidos en todos los isoelectroenfoques de este trabajo a modo de referencia, y los controles varían en función de cada caso. En el ribosoma predominan las formas fosforiladas de las proteínas ácidas, y en algunas preparaciones pueden distinguirse tanto las formas fosforiladas como defosforiladas de las mismas.

En la figura III.10 se puede apreciar, como era de esperar, que el punto isoeléctrico de la proteína P1 α c100his6 expresada en la cepa D7 que se utilizó como control, difiere considerablemente de la proteína P1 α endógena de la cepa silvestre W303 (cepa de referencia), lo que se debe a las modificaciones introducidas en el extremo carboxilo (la presencia de la cisteína en la posición 96 y la cola de 6 histinas). Estas modificaciones también están presentes en cada una de las quimeras, por lo que su punto isoeléctrico además de variar en función de la combinación de secuencias entre P1 α y P2 β en cada caso, también se ve afectado por dichas modificaciones.

El análisis mediante isoelectroenfoque de ribosomas purificados de las cepas D7 que expresan las proteínas quiméricas de la serie pFI38/P1A/P2B que se unen al ribosoma, muestra que la presencia y cantidad de las proteínas ácidas endógenas, no varía en ningún caso con relación al control D7/pFI38/P1 α c96-his6. Este patrón se observa incluso en los ribosomas de la cepa D7 que expresa la proteína 40aaP1 α /P2 β , la cual se une en menor proporción que el resto de las proteínas quiméricas (fig. III.10).

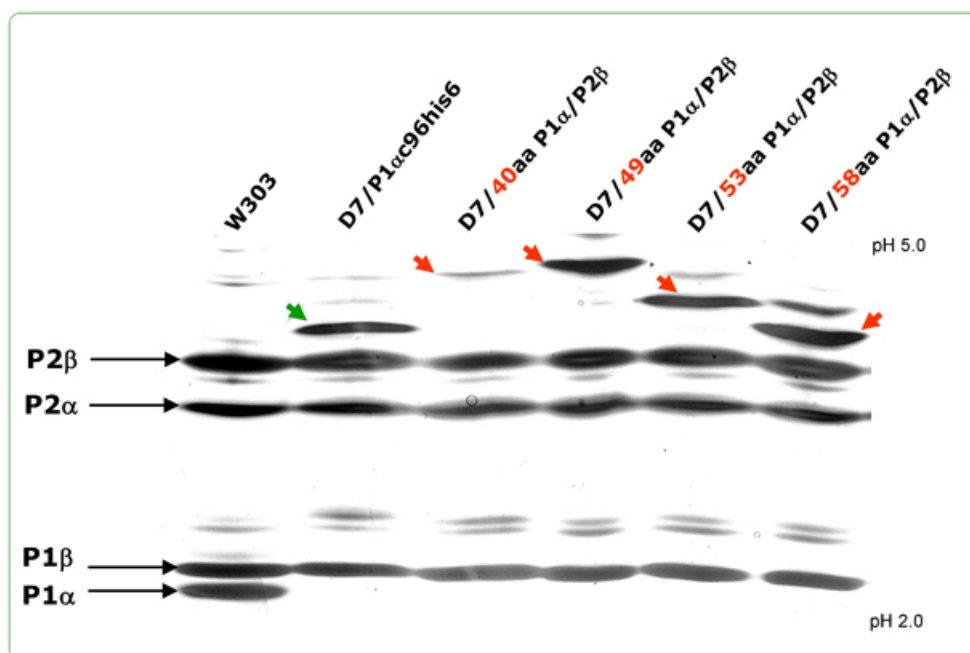


Fig. III.10: Isoelectroenfoque de ribosomas lavados de las cepas D7 que expresan las quimeras de la serie pFI38/P1A/P2B que se unen al ribosoma. Se resolvieron 250 μ g de ribosomas lavados de las cepas que se indican en un gel de isoelectroenfoque en un intervalo de pH 2-5. Se señala la posición de las proteínas ácidas endógenas de la cepa silvestre W303 indicando con una **P** en rojo las formas fosforiladas. Con flechas rojas se indica la ubicación de las proteínas quiméricas y en verde la de la proteína control.

III.2.1.2. Estudio de las proteínas de la serie P2β/P1α.

Con el fin de precisar la región de P2β que determina su unión al tallo ribosómico, se transformó la cepa D5 de *S. cerevisiae* (carente de la proteína P2β) con cada una de las construcciones de la serie pFI38/P2B/P1A, utilizando como control el gen que expresa la proteína P2βc100his6 clonado en el vector pFI38. Con las cepas obtenidas se llevó a cabo el mismo procedimiento de cultivo, recolección y procesamiento de fracciones celulares que se siguió con las cepas resultantes de transformar el mutante D7 con la serie pFI38/P1A/P2B.

Como se puede observar en la figura III.11, en el extracto total S30 se detectaron todas las proteínas quiméricas, lo que indica que la expresión de todos los genes híbridos de esta serie es adecuada y que las proteínas son estables en la célula. Únicamente la proteína 19aaP2β/P1α se detectó en menor cantidad que el resto de proteínas quiméricas, lo que probablemente sea debido a una mayor susceptibilidad a la degradación. Es muy improbable que la menor cantidad de

esta proteína se deba a problemas de expresión dado que todas las construcciones están realizadas sobre el mismo plásmido y tienen las mismas regiones 5'UTR y 3'UTR

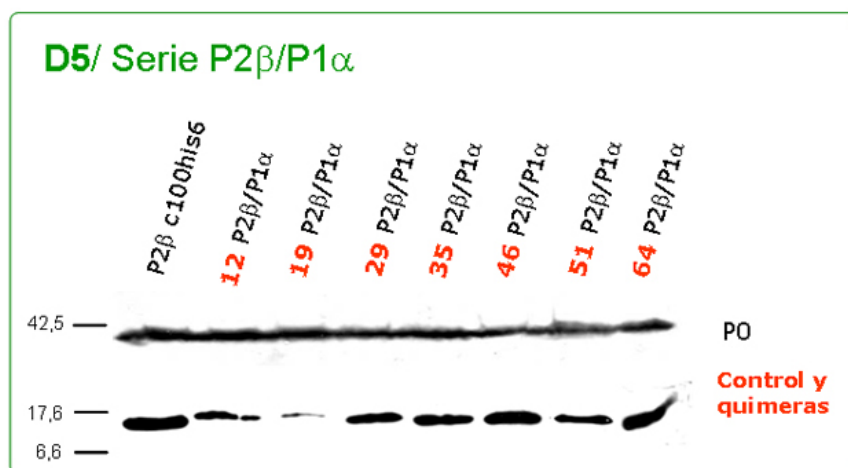


Fig. III.11: Análisis de *Western* de extractos S30 de la cepa D5 transformada con cada una de las construcciones de la serie pFI38/P2B/P1A y el control pFI38/P2βc100his6. Se resolvieron 80μg de extracto S30 en geles de SDS-PAGE 15%. Todas las proteínas quiméricas y el control se detectaron con un anticuerpo anti-histidina comercial y la proteína PO que se utilizó como control de carga de proteína total, fue detectada con el anticuerpo 3BH5.

Al analizar la fracción de los ribosomas crudos (80S) se puede observar que todas las proteínas quiméricas aparecen unidas a la partícula ribosómica, aunque 19aaP2β/P1α esta en baja cantidad. Sin embargo, al analizar la fracción de ribosomas purificados (80S L), se puede observar que únicamente las 3 proteínas que tienen los fragmentos mayores de la región amino-terminal de P2β aparecen unidas al ribosoma, mientras que la proteína 35aaP2β/P1α se detectó débilmente unida a la partícula ribosómica (fig. III.12).

De estos resultados se deduce que la región mínima necesaria del dominio amino-terminal de la proteína P2β para que ésta se una de forma estable al ribosoma en su sitio específico, es una región que comprende las α-hélices H1, H2 y H3 (proteína 46aaP2β/P1α), si bien se ha determinado que incluso con sólo la α-hélice H1 (proteína 12aaP2β/P1α) se produce una unión lábil al mismo sitio.

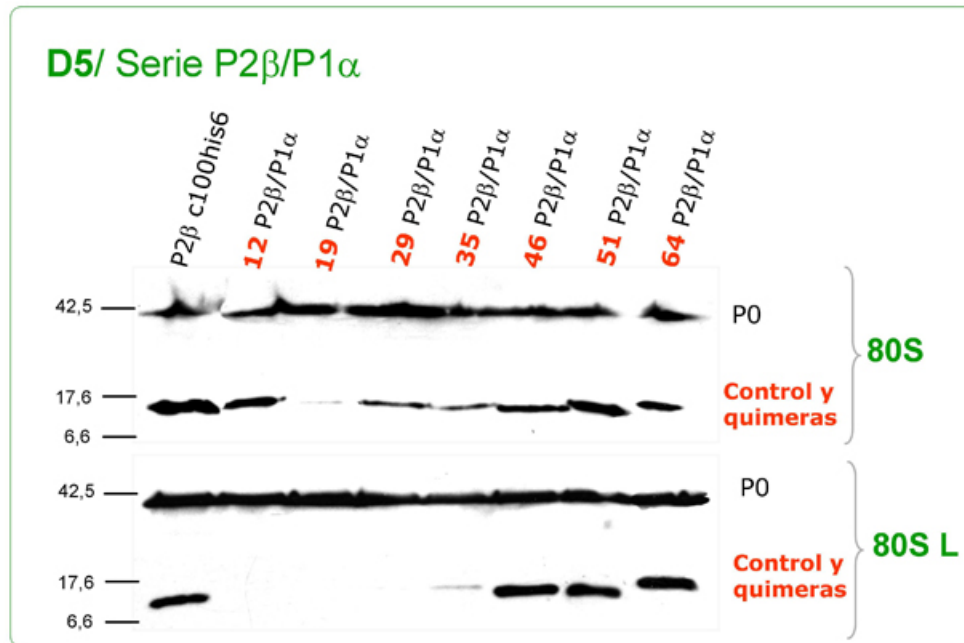


Fig. III.12: Análisis de *Western* de ribosomas crudos (80S) y ribosomas lavados (80S L) de la cepa D5 transformada con cada una de las construcciones de la serie pFI38/P2B/P1A y el control pFI38/P2 β c100his6. Se resolvieron 20 μ g de ribosomas crudos y lavados en geles de SDS-PAGE 15%. Todas las proteínas quiméricas y el control se detectaron con un anticuerpo anti-histidina comercial y la proteína P0 que se utilizó como control de carga de proteína total, fue detectada con el anticuerpo 3BH5.

Los ribosomas purificados de las cepas que expresan las proteínas quiméricas P2 β /P1 α que se unen de forma estable al tallo ribosómico, también se analizaron mediante isoelectroenfoque (fig. III.13). Se pueden apreciar claramente que las proteínas 46aaP2 β /P1 α , 51aaP2 β /P1 α y 64aaP2 β /P1 α , son las que se unen firmemente al ribosoma, mientras que apenas se detecta una tenue banda de la proteína 35aaP2 β /P1 α . Además, en todos los casos, el patrón de bandas de las proteínas ácidas endógenas es muy semejante, excepto en los ribosomas de la cepa D5/pFI38/35aaP2B/P1A, donde se aprecia una disminución de la proteína P1 α endógena, que se explica por la débil unión de la quimera 35aaP2 β /P1 α .

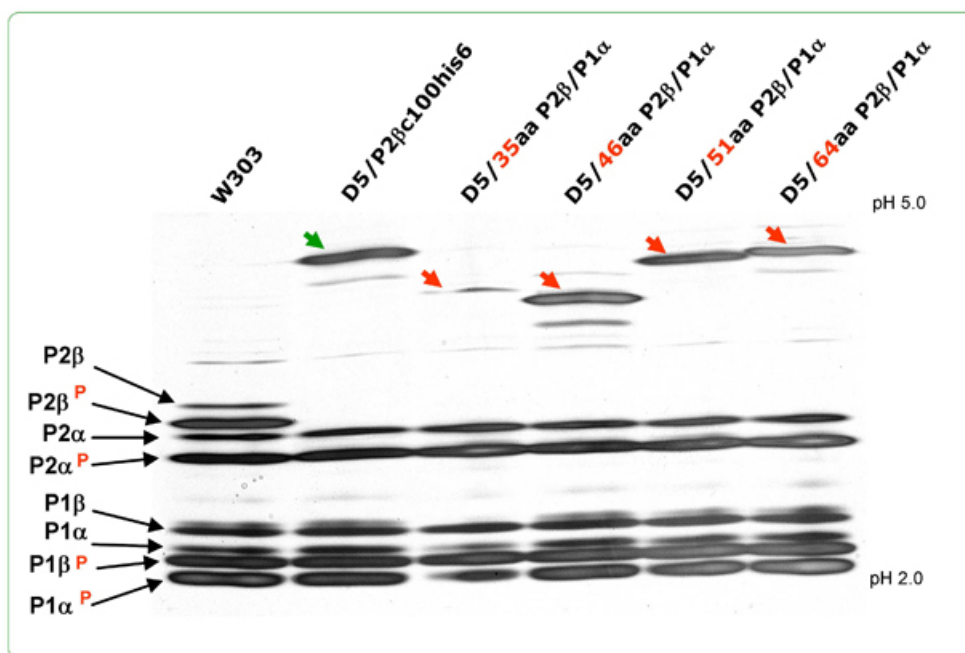


Fig. III.13: Isoelectroenfoque de ribosomas lavados de las cepas D5 que expresan las quimeras de la serie pFI38/P2B/P1A que se unen al ribosoma. Se resolvieron 250 μ g de ribosomas lavados de las cepas que se indican, en un gel de isoelectroenfoque en un intervalo de pH 2-5. Se señala la posición de las proteínas ácidas endógenas de la cepa silvestre W303 indicando con una **P** en rojo las formas fosforiladas. Con flechas rojas se indica la ubicación de las proteínas quiméricas y en verde la de la proteína control.

III.2.2. Estudio de la unión al ribosoma de las proteínas quiméricas en cepas de levadura carentes de dos proteínas ácidas.

Con la finalidad de explorar si en un contexto con menos proteínas ácidas en el tallo ribosómico, la región que determina la unión de P1 α y P2 β al ribosoma varía o continúa siendo la misma que la observada en los mutantes simples D5 y D7, se procedió a transformar con las series de los genes quiméricos las cepas de levadura D45 (carente de proteínas P2 α y P2 β) y D67 (carente de proteínas P1 α y P1 β).

Como se ha mencionado en el apartado I.4.2.2, los ribosomas de las cepas D45 y D67 están desprovistos de proteínas ácidas, y cuando estas cepas son transformadas con alguno de los genes que tienen interrumpidos, en el ribosoma son detectadas proteínas ácidas.

Tomando en cuenta estas consideraciones, sabemos que una vez que las cepas D45 o D67 son transformadas con alguno de los genes quiméricos o con alguno de genes utilizados como control, sólo dos proteínas se van a unir al tallo y su naturaleza dependerá de la quimera y de la cepa utilizada. Con este sistema se puede estudiar el comportamiento de las proteínas quiméricas en ribosomas que tienen un número restringido de proteínas ácidas en el tallo.

III.2.2.1. Estudio de las proteínas de la serie P2 β /P1 α .

Para estudiar si en unas condiciones donde faltan algunas proteínas ácidas en el tallo, las proteínas quiméricas de la serie P2 β /P1 α se unen al ribosoma del mismo modo que lo hacen cuando están presentes todas las proteínas P (cepa D5 transformada), se decidió transformar la cepa D45 (carente de P2 α y P2 β) con cada uno de los plásmidos de la serie pFI38/P2B/P1A y con el control pFI38/P2 β c100his6. Los transformantes seleccionados se crecieron en medio SC-U, y a partir de estos cultivos se obtuvieron fracciones de ribosomas crudos y purificados que fueron analizadas mediante *Western*. En las dos fracciones de ribosomas obtenidas (crudos y purificados) sólo se detectan las proteínas quiméricas 46aaP1 α /P2 β , 51aaP1 α /P2 β y 64aaP1 α /P2 β , que son las que llevan los fragmentos más extensos de la proteína P2 β en el extremo amino-terminal (fig. III.14). Estos resultados difieren ligeramente de los obtenidos con la cepa D5, en donde todas las proteínas quiméricas se detectan unidas a los ribosomas crudos (fig. III.12). Los datos obtenidos con la cepa D45 indican que en ausencia de las proteínas P2 endógenas, la región mínima necesaria para que se produzca la unión de P2 β a ribosomas crudos es de al menos 46 aminoácidos, región que incluye las α -hélices H1, H2 y H3.

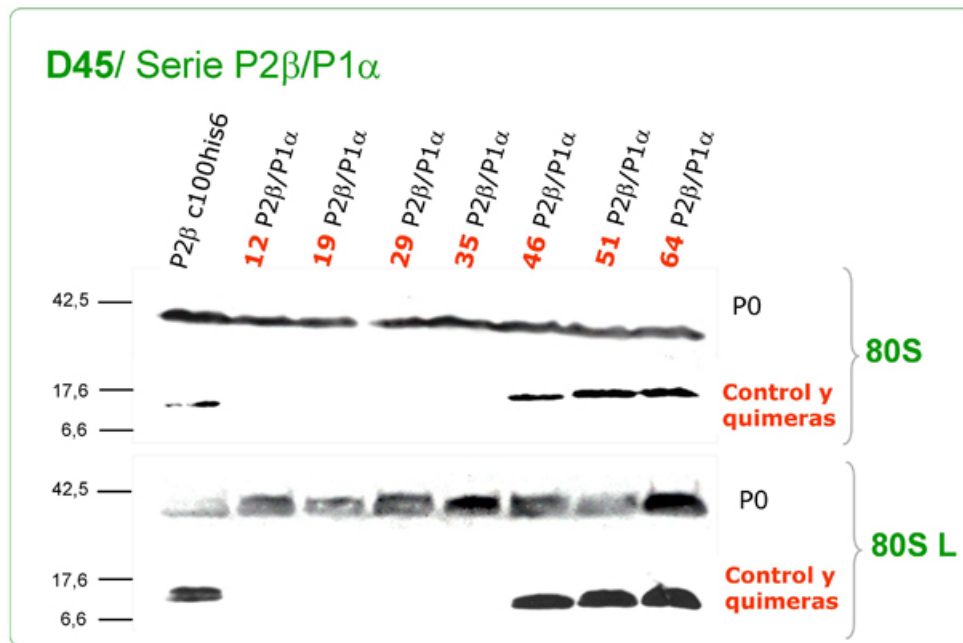


Fig. III.14: Análisis de *Western* de ribosomas crudos (80S) y ribosomas lavados (80S L) de la cepa D45 transformada con cada una de las construcciones de la serie pFI38/P2B/P1A y el control pFI38/P2βc100his6. Se resolvieron 20 µg de ribosomas crudos y lavados en geles de SDS-PAGE 15%. Todas las proteínas quiméricas y el control se detectaron con un anticuerpo anti-histidina comercial y la proteína P0 que se utilizó como control de carga de proteína total, fue detectada con el anticuerpo 3BH5.

El análisis mediante isoelectroenfoque de ribosomas lavados de cada una de las cepas D45 que expresan las cuatro quimeras de la serie pFI38/P2B/P1A que tienen los fragmentos mayores de P2β en el extremo amino-terminal, revela que se produce una situación de todo o nada en cuanto a la presencia de proteínas ácidas endógenas en el ribosoma, que depende de la quimera que se exprese (fig. III.15). En el caso de la cepa donde se expresa la proteína 35aaP2β/P1α que no se une al ribosoma, se puede observar que tampoco hay unión de ninguna proteína ácida endógena, mientras que en los otros tres casos estudiados, se une tanto la proteína P1α como P1β, indicando que es suficiente la presencia de los primeros 46 aminoácidos (α-hélices H1, H2 y H3) de P2β para que ésta interaccione con las dos proteínas de tipo P1. Este resultado indica que hay dos poblaciones de ribosomas, una población cuyo tallo contiene la proteína quimérica y P1α, y otra donde el tallo está compuesto por la quimera y la proteína P1β, de acuerdo con resultados previos que señalan que el ribosoma tiene una composición monomérica en proteínas ácidas (Guarinos y col., 2003).

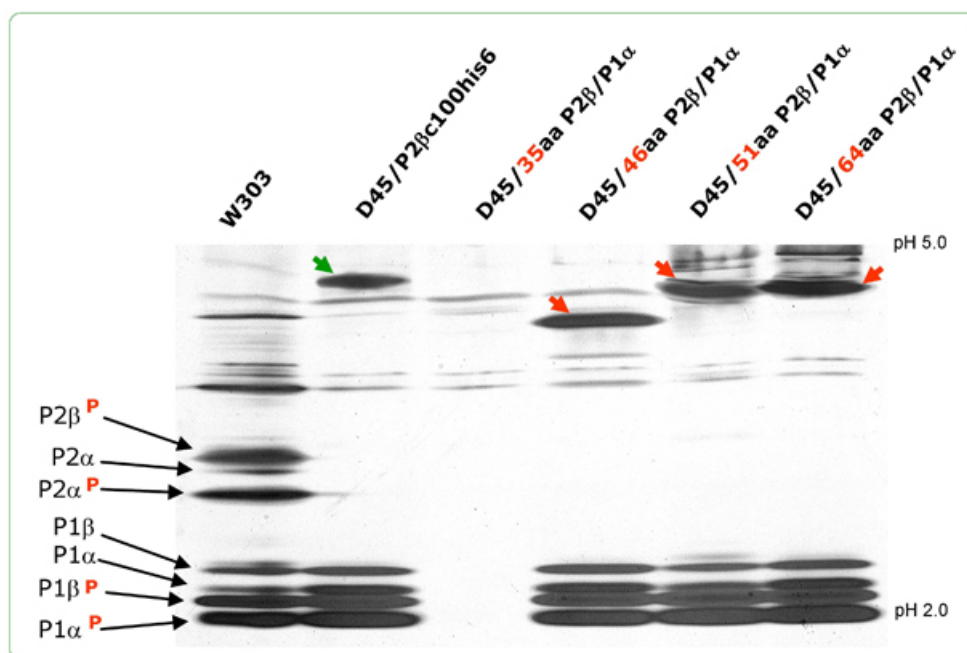


Fig. III.15: Isoelectroenfoque de ribosomas lavados de las cepas D45 que expresan las quimeras de la serie pFI38/P2B/P1A que tienen los fragmentos mayores de P2β en el extremo amino-terminal. Se resolvieron 250 μg de ribosomas lavados de las cepas que se indican, en un gel de isoelectroenfoque en un intervalo de pH 2-5. Se señala la posición de las proteínas ácidas endógenas de la cepa silvestre W303 indicando con una **P** en rojo las formas fosforiladas. Con flechas rojas se indica la ubicación de las proteínas quiméricas y en verde la de la proteína control.

Adicionalmente, en el isoelectroenfoque se observa que tanto en la cepa control como en las cepas que expresan las quimeras que se unen al ribosoma, la proporción de proteínas P1 no varía en ningún caso. No se observan diferencias entre la cantidad de P1α y P1β de cada cepa, en todos los casos la cantidad de cada proteína P1 es muy similar.

III.2.2.2. Estudio de de las proteínas de la serie P1α/P2β.

Para comprobar si la presencia de las 3 primeras α-hélices es también necesaria para que P1α se una al ribosoma en unas condiciones donde faltan algunas de las proteínas ácidas en el tallo, se procedió a expresar las proteínas de la serie pFI38/P1α/P2β en el disruptante D67 (carente de P1α y P1β). El análisis por *Western* de los ribosomas de estas cepas reveló que en relación con el mutante simple D7 no hay variabilidad en cuanto a la región que determina la unión de P1α al ribosoma. En las dos fracciones ribosómicas analizadas (80S y 80S lavados) los resultados coinciden con los obtenidos en el estudio con la cepa

D7 (fig. III.9), la unión se establece a partir de los 40 aminoácidos de P1 α , siendo más fuerte de la tercera α -hélice en adelante (fig. III.16).

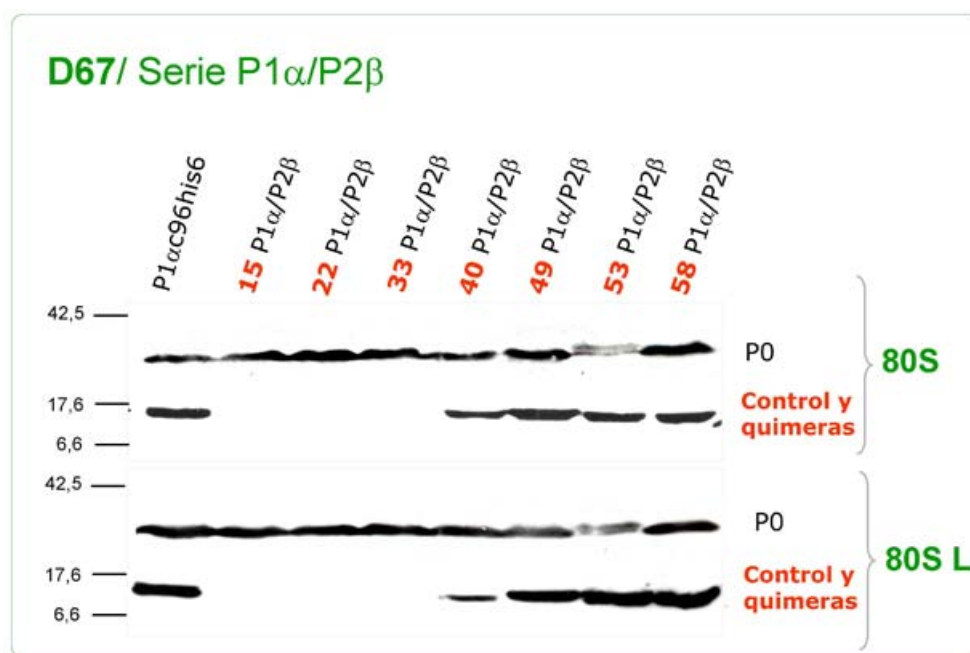


Fig. III.16: Análisis de *Western* de ribosomas crudos (80S) y ribosomas lavados (80S L) de la cepa D67 transformada con cada una de las construcciones de la serie pFI38/P1A/P2B y el control pFI38/P2 β c100his6. Se resolvieron 20 μ g de ribosomas crudos y lavados en geles de SDS-PAGE 15%. Todas las proteínas quiméricas y el control se detectaron con un anticuerpo anti-histidina comercial y la proteína P0 que se utilizó como control de carga de proteína total, fue detectada con el anticuerpo 3BH5.

En el isoelectroenfoque de la figura III.17 se puede observar que tanto en los ribosomas del control D67/pFI38/P1 α c96his6 como los de las cepas D67/pFI38/49aaP1A/P2B, D67/pFI38/53aaP1A/P2B y D67/pFI38/58aaP1A/P2B, ambas proteínas P2 están presentes, mientras que en los ribosomas de la cepa D67/pFI38/40aaP1A/P2B no se observa ninguna de las proteínas P2. Al igual que ocurre con el mutante D45, al transformar la cepa D67 en la célula van a existir dos poblaciones de ribosomas, una población cuyos ribosomas contienen la proteína quimérica y P2 α , y otra donde está presente la quimera y la proteína P2 β . Se puede apreciar que en todos los casos la proteína P2 β se une en mayor proporción que la proteína P2 α , lo que corrobora las observaciones de estudios anteriores que señalan que se produce una unión preferente entre P1 α y P2 β . También se puede observar que la intensidad de las bandas correspondientes a las proteínas P2 va en aumento conforme la región de P1 α presente en las quimeras es más extensa. Esta es una diferencia en relación con los resultados obtenidos

con la cepa D7, en donde el patrón de bandas de las proteínas endógenas es igual en todos los casos (fig. III.10). Esto indica que en ausencia de P1 β son suficientes sólo 49 aminoácidos de P1 α para que las P2 también se unan al ribosoma. En el caso de la proteína P2 β su anclaje al tallo ribosómico mediado por P1 α , parece ser completamente estable cuando está presente en el tallo la quimera que lleva los primeros 53 aminoácidos de P1 α (fig. III.17).

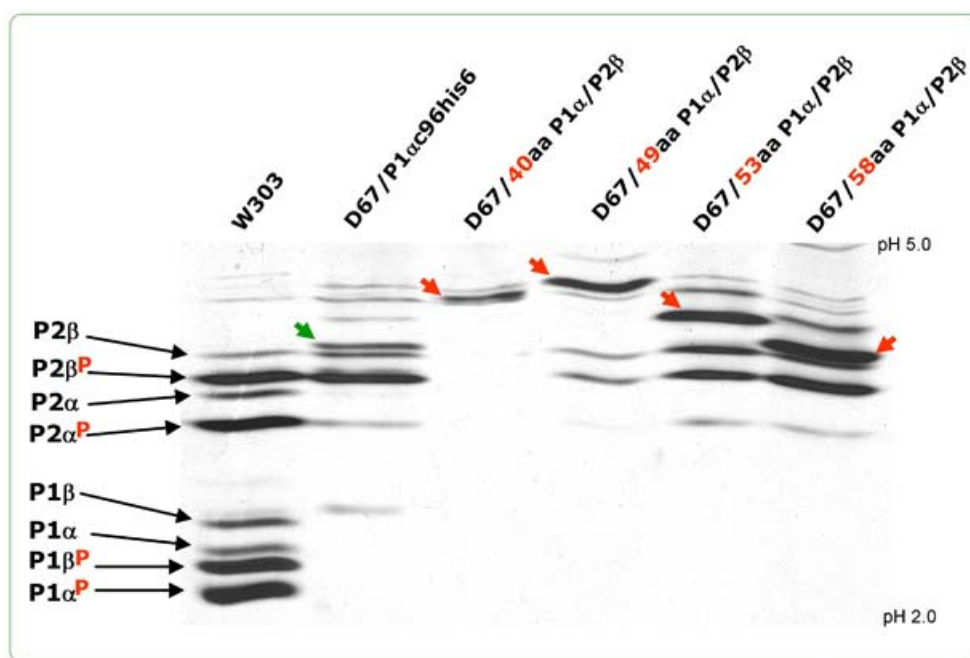


Fig. III.17: Composición en proteínas ácidas de ribosomas de las cepas D67 que expresan las 4 últimas construcciones de la serie pFI38/P1 α /P2 β . Se resolvieron 250 μ g de ribosomas lavados de las cepas que se indican en un gel de isoelectroenfoque en un intervalo de pH 2-5. Se señala la posición de las proteínas ácidas endógenas de la cepa silvestre W303. Con flechas rojas se indica la ubicación de las proteínas quiméricas y en verde la de la proteína control.

III.3. DETERMINACIÓN DEL SITIO DE INTERACCIÓN ENTRE LAS PROTEÍNAS P1 α Y P2 β .

La relación entre los componentes del tallo ribosómico ha sido extensamente estudiada. Gran parte de los esfuerzos realizados se han dirigido a esclarecer en que forma se relacionan las proteínas ácidas entre sí. Estudios llevados a cabo con organismos procariotas indican que el dominio amino-terminal de la proteína L7/L12 es el responsable de las interacciones que se producen entre los monómeros de esta proteína. Por otro lado, experimentos de solubilización de proteínas, han demostrado que la asociación entre las proteínas P1 y P2 de rata se

produce por la interacción de sus extremos amino-terminales (Gonzalo y col., 2001).

A pesar de que son muchos los estudios que demuestran que en *S. cerevisiae* existe una unión preferente entre los pares $P1\alpha$ - $P2\beta$ y $P1\beta$ - $P2\alpha$ (apartado I.4.2.2.), asociaciones que son importantes para su interacción con el ribosoma, las regiones involucradas en estas interacciones no han sido identificadas. El disponer de las proteínas quiméricas construidas en este trabajo, permite explorar mediante la técnica de doble-híbrido la capacidad de interacción entre éstas y las proteínas silvestres del tallo ribosómico, así como relacionar este proceso con la unión de las quimeras al ribosoma.

III.3.1. Fusión de los genes de las proteínas quiméricas de la serie $P2\beta/P1\alpha$ y de la serie $P1\alpha/P2\beta$ al gen del domino de unión de GAL-4.

El objetivo que se planteó alcanzar en el presente trabajo con la técnica de doble-híbrido, fue el de determinar si las proteínas $P1\alpha$ y $P2\beta$ interaccionan entre ellas a través de su extremo amino-terminal, y en caso de que se produzca tal interacción, precisar qué región del extremo amino de $P1\alpha$ interacciona con $P2\beta$, y qué secuencias de la región amino-terminal de $P2\beta$ intervienen en la unión a $P1\alpha$.

En nuestro laboratorio se disponía de las proteínas $P1\alpha$ y $P2\beta$ silvestres clonadas en el vector que expresa el dominio de activación del factor de transcripción GAL-4 (vector pADC). Estas construcciones están hechas de manera que la región amino-terminal de ambas proteínas está libre, mientras que el dominio carboxilo-terminal está fusionado al dominio de activación de GAL4.

Debido a que las proteínas $P1\alpha$ y $P2\beta$ estaban clonadas en el vector PADC, se procedió a clonar las primeras 5 construcciones de ambas series de genes quiméricos en el vector que expresa el dominio de unión de GAL-4 (vector pBDC). Los pasos que se siguieron para la clonación de todos los genes quiméricos en el vector pBDC se esquematizan en la figura III.18. Esta estrategia se siguió para la clonación en pBDC, tanto de los genes híbridos de la serie $P1A/P2B$ como los de la

serie P2B/P1A, utilizando en cada caso la combinación de cebadores adecuada (tablas VI.11 y VI.12).

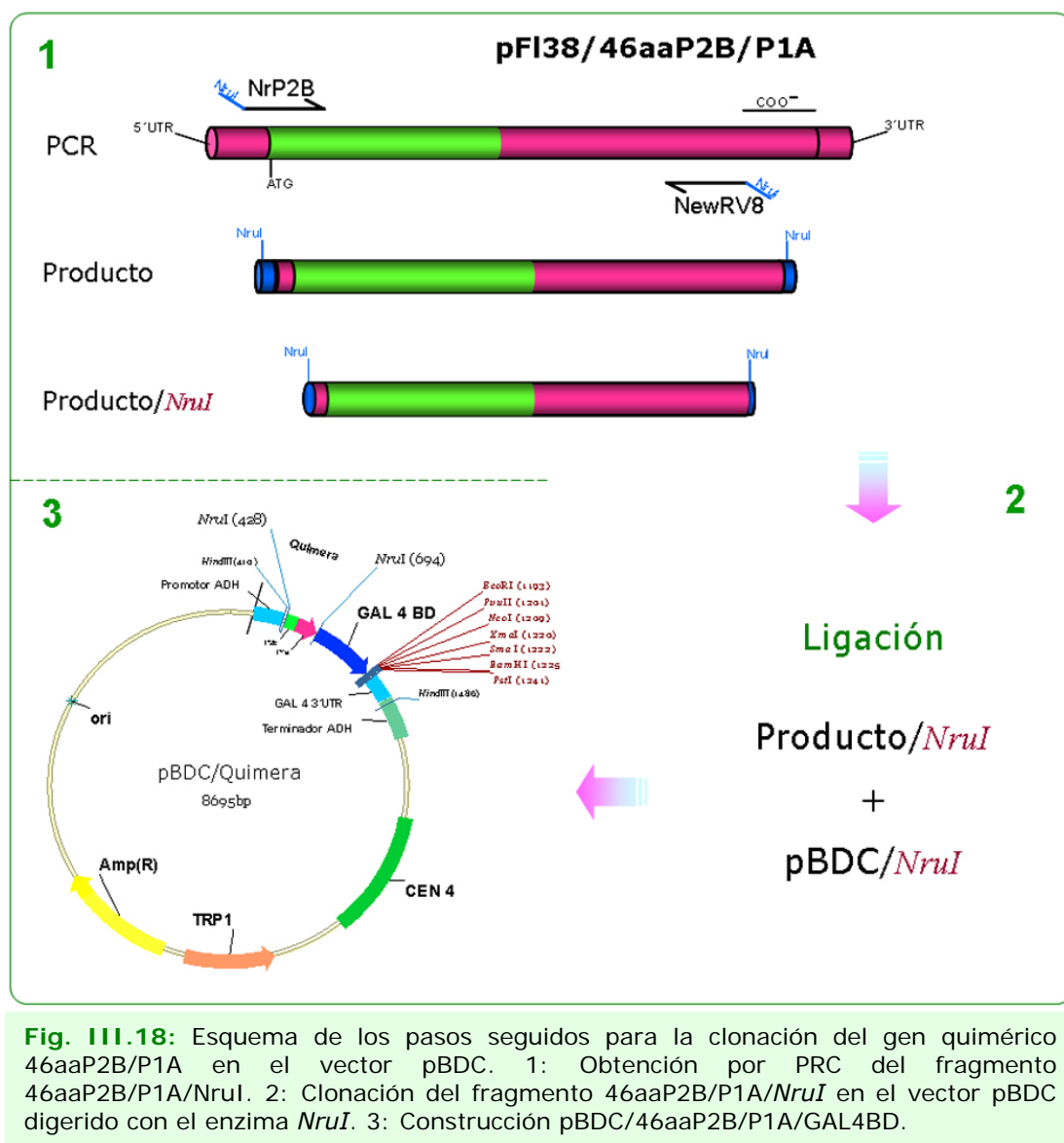
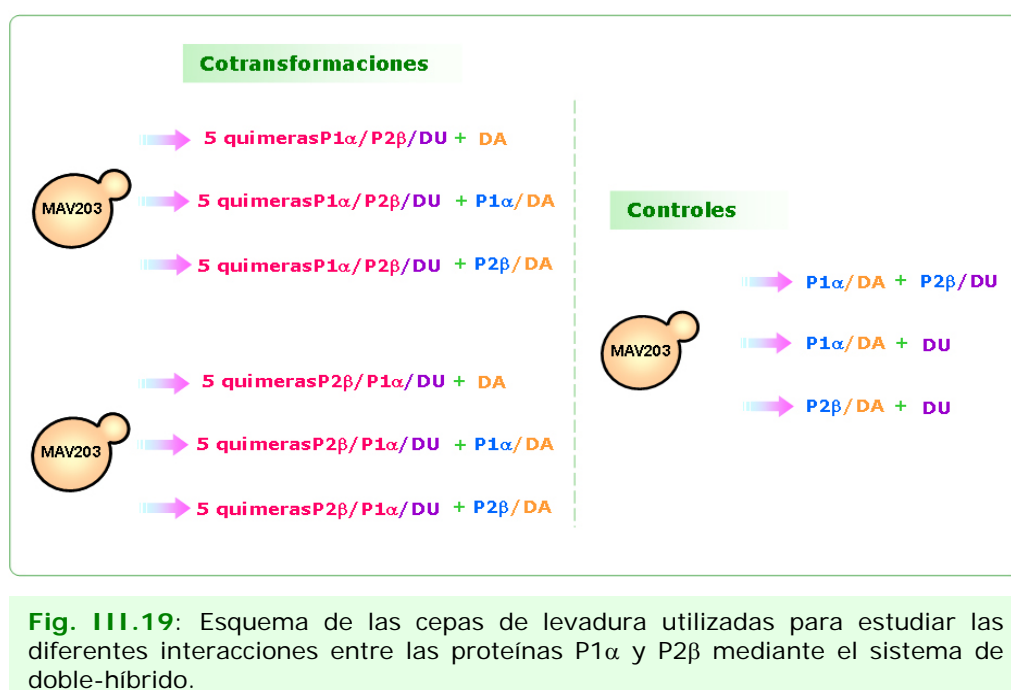


Fig. III.18: Esquema de los pasos seguidos para la clonación del gen quimérico 46aaP2B/P1A en el vector pBDC. 1: Obtención por PRC del fragmento 46aaP2B/P1A/NruI. 2: Clonación del fragmento 46aaP2B/P1A/NruI en el vector pBDC digerido con el enzima *NruI*. 3: Construcción pBDC/46aaP2B/P1A/GAL4BD.

La amplificación de los genes de todas las proteínas que se fusionaron a los dominios de GAL-4, tanto los de las proteínas quiméricas como los de las proteínas silvestres P1 α y P2 β , se hizo de forma que el gen resultante carecía de parte del extremo carboxilo-terminal, en concreto de los últimos 22 aminoácidos. Esto se debió a que en estudios anteriores realizados en nuestro laboratorio, se observó que la presencia de estos 22 aminoácidos daba fondo en los ensayos de interacción.

La clonación de los genes quiméricos en el vector pBDC se hizo de manera tal que, el gen del dominio de unión de GAL 4 (GAL 4 BD) queda localizado en el extremo carboxilo-terminal del gen de la proteína quimérica; así el dominio amino-terminal de esta última queda libre. Para ello, la inserción del gen de interés se realizó en el sitio *NruI* del vector pBDC, localizado entre el promotor ADH y la ORF del dominio de unión de GAL 4 (fig. III.18), por lo que para amplificar los genes quiméricos se utilizaron cebadores que introducen la diana *NruI* en ambos extremos del fragmento amplificado. En la tabla VI.7 se especifican los oligonucleótidos utilizados para la obtención de estas construcciones, y los moldes y combinaciones de cebadores utilizadas en cada caso se detallan en las tablas VI.11 y VI.12. Una vez realizados todas las clonaciones de los genes quiméricos en el vector pBDC, se procedió a cotransformar la cepa MAV203 con diferentes combinaciones de éstos y los vectores pADC/P1 α y pADC/P2 β .



Los clones que resultaron de las diferentes cotransformaciones, fueron seleccionados en placas de medio SC-LEU-TRP, debido a que los vectores pADC y pBDC tienen como marcadores de selección los genes LEU y TRP, respectivamente. En el sistema de doble-híbrido utilizado en este trabajo (apartado VI.11) la expresión de los genes HIS3, LACZ y URA3 sirve como indicador de interacción; en los ensayos realizados, el gen indicador de interacción fue el gen URA, por lo que las diluciones seriadas de los cultivos de las diferentes

cepas cotransformadas fueron sembradas en placas de medio SC-URA y en paralelo, se sembraron duplicados en placas de SC-LEU-TRP como control de crecimiento. Los controles de interacción utilizados fueron cepas que previamente habían sido obtenidas en nuestro laboratorio. El control positivo fue la cepa MAV203 cotransformada con los vectores pBDC/P1 α y pADC/P2 β , y como controles negativos cotransformada con las combinaciones pADC/P1 α -pBDC y pADC/P2 β -pBDC. En la figura III.19 se presenta un esquema de las cepas utilizadas para estudiar las diferentes interacciones.

III.3.2. Interacción de las proteínas quiméricas de la serie P1 α /P2 β con las proteínas P2 β y P1 α .

Para estudiar si alguna región del extremo amino de P1 α interacciona con la proteína P2 β , se cotransformó la cepa MAV203 con el vector que expresa la proteína P2 β fusionada al dominio de activación de GAL-4 (pADC/P2 β) en combinación con cada uno de los plásmidos pBDC donde se han clonado los genes de las 5 primeras quimeras de la serie P1A/P2B (pBDC/P1A/P2B). Adicionalmente, se realizaron cotransformaciones de MAV203 con cada uno de los vectores pBDC/P1A/P2B y el vector pADC/P1 α , para explorar si se produce alguna interacción de la proteína P1 α silvestre con alguna de las regiones de P1 α ó P2 β presente en las proteínas quiméricas de la serie P1 α /P2 β .

Previo a realizar los ensayos de interacción se comprobó que las diferentes proteínas codificadas por los plásmidos construidos para el ensayo de dos híbridos se expresaban células. Para ello, se obtuvieron fracciones S30 de cada una de las cepas cotransformadas y las diferentes proteínas fueron detectadas por *Western*. Estas fracciones se resolvieron por duplicado en geles de SDS-PAGE, se transfirieron a membranas de nitrocelulosa y se revelaron utilizando los anticuerpos adecuados para detectar todas las proteínas fusionadas tanto al dominio de activación como al dominio de unión en cada caso. Los resultados indican que, aunque a diferente nivel dependiendo de la proteína ensayada, todas las proteínas de fusión se expresan y son estables en la célula (figuras III.20; III.21). Estos resultados por lo tanto, indican que los resultados negativos en las interacciones no serán debidos a una ausencia de la expresión de las proteínas estudiadas.

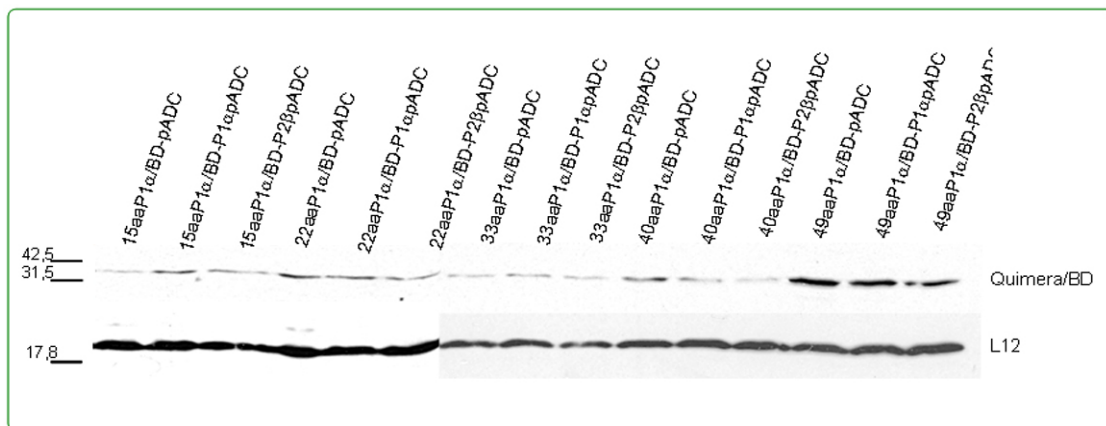


Fig. III.20: Análisis de *Western* de extractos S30 de las proteínas quimera de la serie P1 α /P2 β fusionadas al dominio de unión de GAL4. Se resolvieron 80 μ g de extracto S30 en geles de SDS-PAGE 15%. Todas las proteínas de fusión se detectaron con un anticuerpo comercial anti-dominio de unión de GAL4. La proteína L12 se utilizó como control de carga de proteína total, y fue detectada con el anticuerpo anti-L12(1AD7).

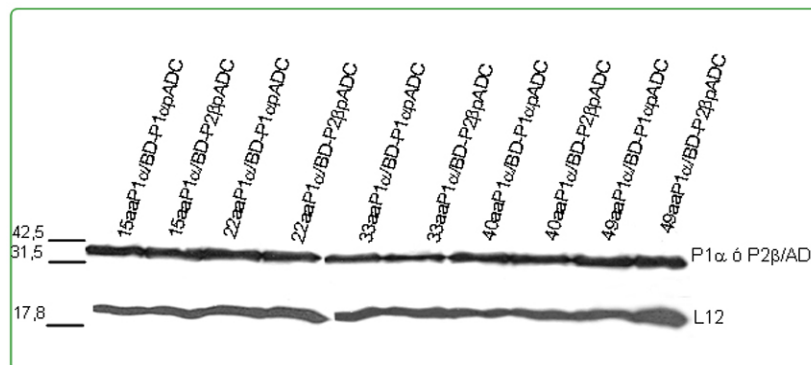


Fig. III.21: Análisis de *Western* de extractos S30 de las proteínas silvestre P1 α y P2 β fusionadas al dominio de activación de GAL4. Se resolvieron 80 μ g de extracto S30 en geles de SDS-PAGE 15%. Todas las proteínas de fusión se detectaron con un anticuerpo comercial anti-dominio de activación de GAL4. La proteína L12 se utilizó como control de carga de proteína total, y fue detectada con el anticuerpo anti-L12(1AD7).

El análisis de las interacciones mostró que sólo se producen interacciones entre P2 β y las proteínas quiméricas 40aaP1 α /P2 β y 49aaP1 α /P2 β (fig. III.22).

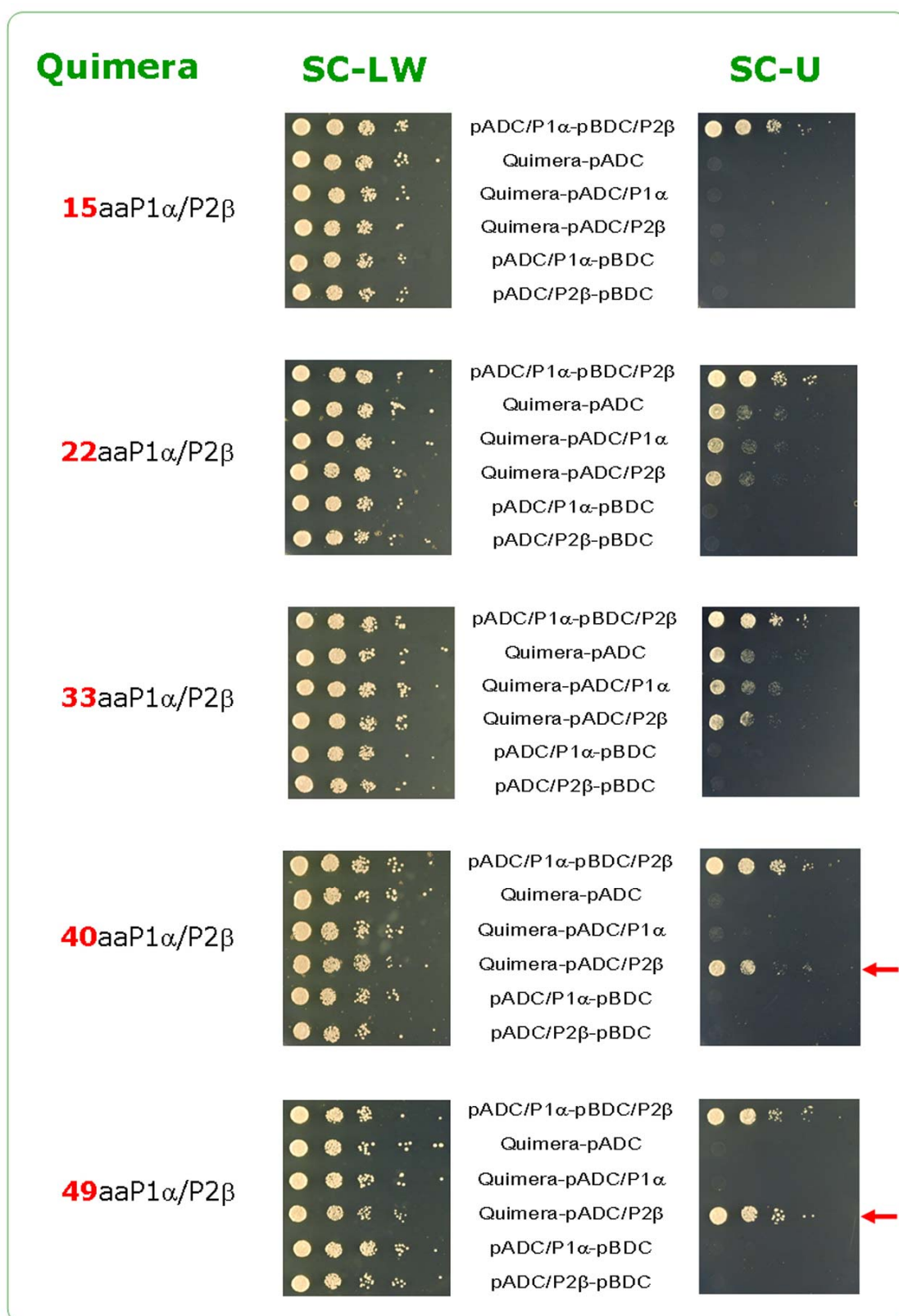


Fig. III.22: Interacciones de las proteínas quiméricas de la serie P1 α /P2 β con las proteínas silvestres P1 α y P2 β mediante el sistema de doble-híbrido.

La interacción entre la proteína P2 β y la quimera 40aaP1 α /P2 β es un poco más débil que la que se produce entre las proteínas P2 β y 49aaP1 α /P2 β . Estos resultados se correlacionan con los obtenidos en los ensayos de unión a ribosoma (fig. III.9), en donde se observa que la unión al tallo se establece a partir de los 40 aminoácidos de P1 α , y que comienza a ser más fuerte a partir de los 49 aminoácidos. En los resultados obtenidos, también se puede observar que no hay crecimiento en las placas de SC-URA en ninguna de las filas correspondientes a las cepas cotransformadas con las construcciones pBDC/P1A/P2B y pADC/P1 α , indicando que no se establece interacción entre la proteína P1 α silvestre con ninguno de los fragmentos de P1 α o de P2 β presentes en estas quimeras (fig. III.22).

Las proteínas quiméricas 22aaP1 α /P2 β y 33aaP1 α /P2 β mostraron un ligero crecimiento tanto en la cepa cotransformada con la combinación pBDC/quimera-pADC/P2 β como con pBDC/quimera-pADC/P1 α . Sin embargo, estas interacciones no son consideradas como positivas por el hecho de que también hay un crecimiento semejante en la fila correspondiente al control negativo pBDC/quimera-pADC/vacío. A la vista de este resultado, se decidió repetir el ensayo desde la cotransformación y los resultados obtenidos fueron los mismos. Resulta curioso que esto no ocurriera en ningún otro caso debido a que todas las construcciones están hechas de la misma manera y el ensayo se realizó a la vez y en las mismas condiciones.

III.3.3. Interacción de las proteínas quiméricas de la serie P2 β /P1 α con las proteínas P1 α y P2 β .

Con el fin de explorar si alguna región del extremo amino-terminal de P2 β interacciona con P1 α , la cepa MAV203 fue cotransformada con el plásmido pADC/P1 α y cada una de las construcciones pBDC/P2B/P1A. Del mismo modo que con la serie P1A/P2B, también se estudió si se produce alguna interacción entre la proteína P2 β y alguna de las regiones de P1 α o P2 β presente en las proteínas quiméricas P2 β /P1 α .

Al igual que se hizo en los ensayos anteriores, de cada una de las cepas utilizadas en estos ensayos se obtuvieron fracciones S30 y las diferentes proteínas de fusión se detectaron por *Western*. En las figuras III.23 y III.24, se puede

observar que todas las proteínas de fusión son detectadas en cantidad semejante, indicando que se expresan correctamente y que son estables, por lo que se descarta que cualquier ausencia de interacción se deba a que estas proteínas no se expresan o se degradan.

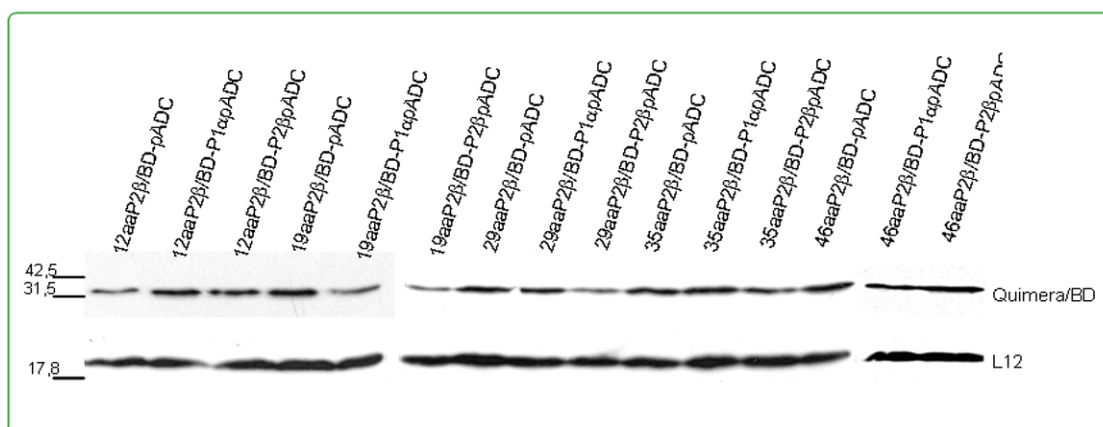


Fig. III.23: Análisis de *Western* de extractos S30 de las proteínas quimera de la serie P2β/P1α fusionadas al dominio de unión de GAL4. Se resolvieron 80μg de extracto S30 en geles de SDS-PAGE 15%. Todas las proteínas de fusión se detectaron con un anticuerpo comercial anti-dominio de unión de GAL4. La proteína L12 se utilizó como control de carga de proteína total, y fue detectada con el anticuerpo anti-L12(1AD7).

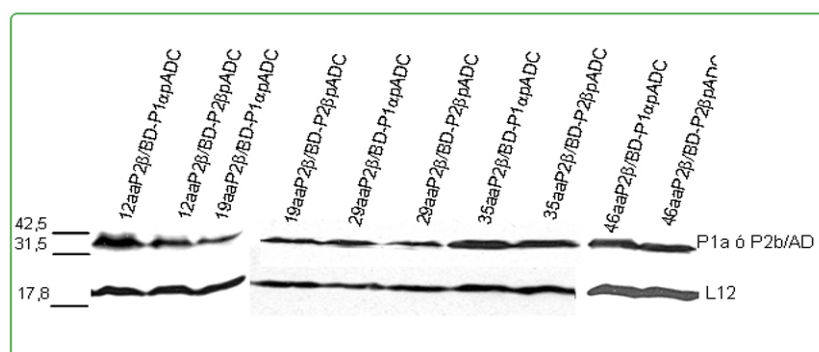


Fig. III.24: Análisis de *Western* de extractos S30 de las proteínas silvestre P1α y P2β fusionadas al dominio de activación de GAL4. Se resolvieron 80μg de extracto S30 en geles de SDS-PAGE 15%. Todas las proteínas de fusión se detectaron con un anticuerpo comercial anti-dominio de activación de GAL4. La proteína L12 se utilizó como control de carga de proteína total, y fue detectada con el anticuerpo anti-L12(1AD7).

En los ensayos de interacción, de todas las combinaciones estudiadas sólo se observa crecimiento en la placa de SC-URA en la fila correspondiente a la interacción entre pADC/P1α y pBDC/46aaP2B/P1A (fig. III.25).

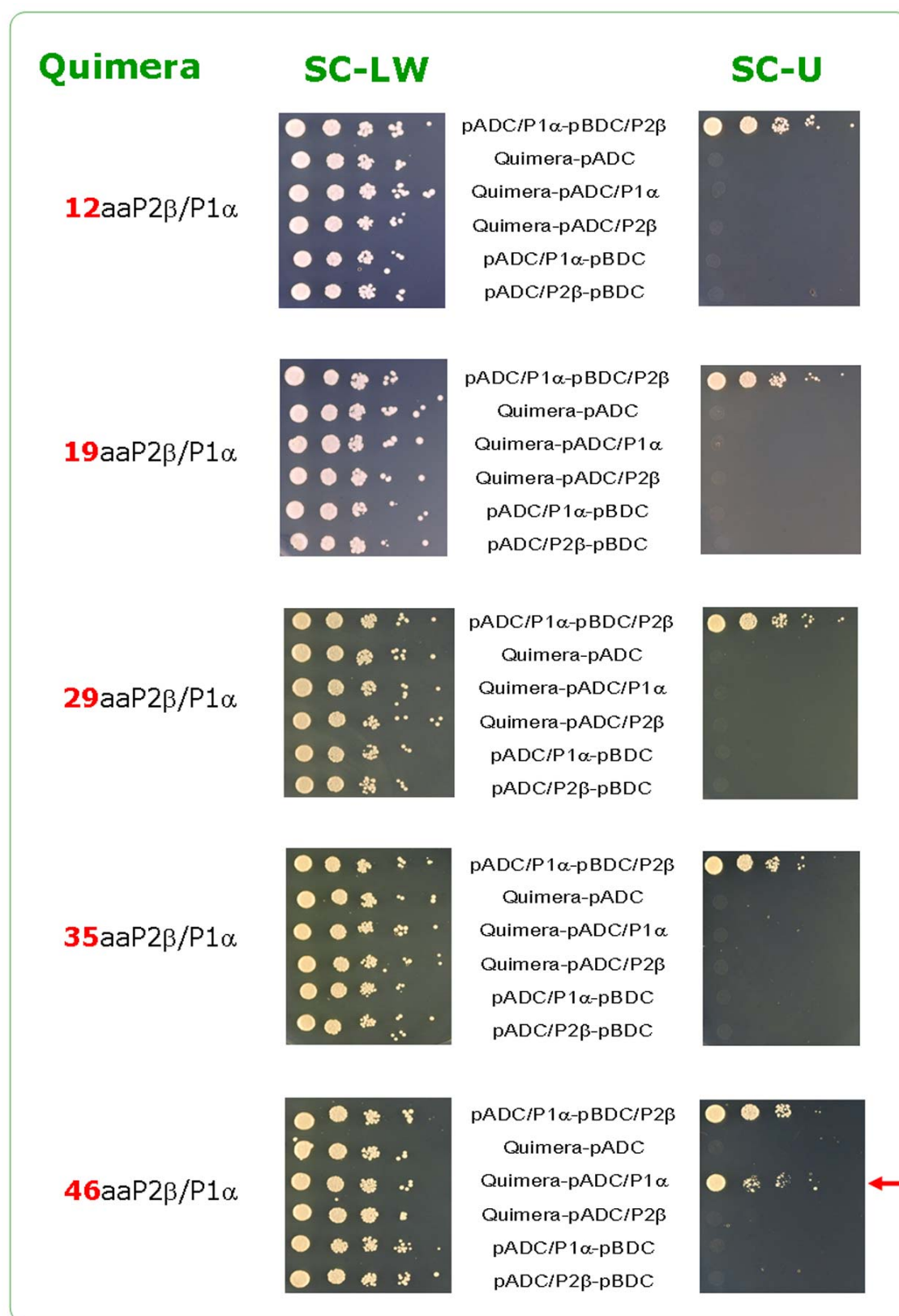


Fig. III.25: Interacciones de las proteínas quiméricas de la serie P2β/P1α con las proteínas silvestres P1α y P2β mediante el sistema de doble-híbrido.

Este resultado deja patente que se requiere de al menos 46 aminoácidos de la proteína P2 β para que ésta interaccione con la proteína P1 α . Al igual que en el caso de la serie P1A/P2B, los resultados que aquí se presentan se relacionan con los obtenidos en los ensayos de unión a ribosoma, donde se observa que hay unión de P2 β al ribosoma a partir del aminoácido 46 (fig. III.12). Estos resultados indican que la interacción entre las proteínas P1 y P2 es un proceso estrechamente relacionado con la unión de éstas al ribosoma.

Por otro lado, en ninguno de los casos donde la cepa MAV203 fue cotransformada con las construcciones pBDC/P2B/P1A y pADC/P2 β se produjo un crecimiento en el medio SC-URA, resultados que señalan que no es posible que las regiones de P1 α y P2 β presentes en estas proteínas quiméricas interaccionen con la proteína silvestre P2 β .

III.4. ESTUDIO FUNCIONAL DEL DOMINIO CARBOXILO-TERMINAL DE LAS PROTEÍNAS P1 α Y P2 β .

Todos los estudios realizados sobre el dominio carboxilo de las proteínas ácidas han adjudicado a esta región la propiedad de interaccionar tanto con los factores solubles de traducción como con otras proteínas del ribosoma (ver apartado I.3.1.2.). En *S. cerevisiae* a pesar de que los últimos 13 aminoácidos de la región carboxilo-terminal de todas las proteínas P son idénticos, experimentos de entrecruzamiento químico han mostrado que las proteínas de tipo P2 reaccionan con un mayor número de proteínas ribosómicas que las de tipo P1. Además, se encontró que la proteína P2 β interacciona con más proteínas que la proteína P2 α , indicando que sus extremos carboxilo alcanzan regiones que se solapan pero no son idénticas (Qiu y col., 2006).

Resultaría interesante estudiar cada proteína ácida por separado para así determinar si cada una tiene una función específica en el tallo ribosómico, pero *in vivo* no existe la posibilidad de que se una sólo una proteína al ribosoma; el tallo debe estar compuesto por al menos una proteína de tipo P1 y otra de tipo P2 (Remacha y col., 1992), por lo que la composición del tallo ribosómico de las cepas de *S. cerevisiae* sólo puede ser de dos o de cuatro proteínas ácidas.

Con la finalidad de establecer si realmente existen diferencias funcionales entre las diferentes proteínas ácidas, nos planteamos estudiar si la presencia de dos dominios carboxilo-terminales del mismo tipo condiciona de alguna forma la actividad del tallo en la célula. Para tal fin, se decidió utilizar diferentes cepas de levadura carentes de proteínas ácidas, que expresan las proteínas quiméricas que se unen de forma estable al ribosoma. Cuando estas proteínas se unen al ribosoma, la región amino-terminal queda comprometida en esta unión, mientras que la secuencia que incluye la región bisagra y carboxilo-terminal quedan libres para interactuar con otras proteínas y con los factores solubles de la traducción. En el caso de las proteínas quiméricas estas regiones pertenecen a la proteína del grupo contrario. Esta condición, permite que al transformar la cepa disruptante adecuada con alguna de las quimeras que se unen al ribosoma, se produzca una situación en la que en el tallo están presentes dos regiones carboxilo del mismo tipo. Las cepas de levadura utilizadas fueron D5/pFI38/46aaP2B/P1A, D7/pFI38/49aaP1A/P2B, D45/pFI38/46aaP2B/P1A y D67/pFI38/49aaP1A/P2B. Además, se utilizaron también cepas carentes de tres proteínas ácidas, la cepa D456 (carente de P2 α , P2 β y P1 β) y la cepa D467 (carente de P1 α , P1 β y P2 α), que fueron transformadas con los plásmidos pFI38/46aaP2B/P1A y pFI38/49aaP1A/P2B, respectivamente. Las proteínas quiméricas que expresan estas cepas de levadura, son las que tienen la región mínima necesaria para que se produzca una unión estable al ribosoma (fig. III.9 y III.12) y que por otra parte, tienen la región más amplia de la proteína contraria en el extremo carboxilo-terminal (fig. III.26).

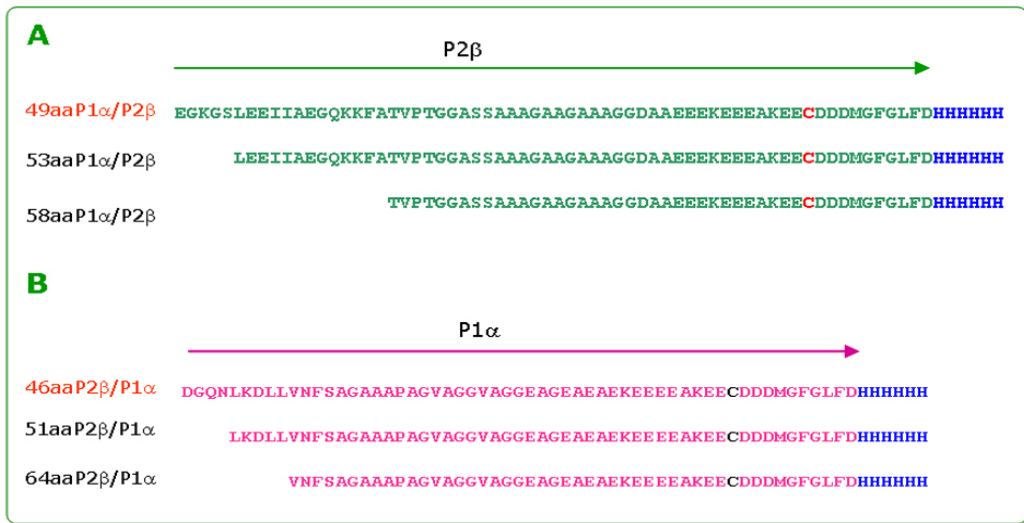


Fig. III.26: Alineamiento de las secuencias de los dominios carboxilo-terminal de las proteínas quiméricas que se unen de forma estable al ribosoma.

Se realizaron curvas de crecimiento en medio rico YPD de cada una de las cepas seleccionadas para estudiar si la tasa de crecimiento de éstas sufría alguna modificación en relación con las cepas controles. El tiempo de generación se calculó haciendo un promedio de tres curvas de cada cepa.

En la figura III.27 se muestra una situación en donde hay cuatro proteínas ácidas en el tallo ribosómico y cuatro dominios carboxilo-terminales diferentes (cepa W303), y dos situaciones en las que a pesar de haber cuatro proteínas ácidas, sólo hay tres tipos de dominios carboxilo-terminales diferentes.

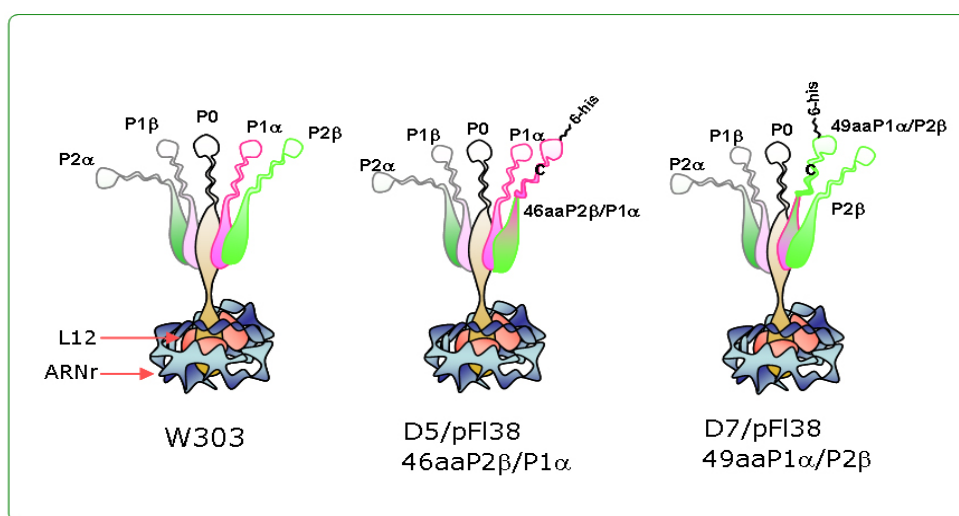


Fig. III.27: Representación de la composición del tallo ribosómico. En la cepa W303 se puede observar la presencia de una proteína de cada tipo. En las cepas D5/pFI38/46aaP2B/P1A y D7/pFI38/49aaP1A/P2B se observa que hay cuatro proteínas ácidas pero sólo tres tipos de dominios carboxilo-terminales.

III.4.1. Efecto de la expresión de las proteínas 46aaP2β/P1α y 49aaP1α/P2β en cepas de levadura carentes de una proteína ácida.

En estos ensayos se utilizaron las cepas D5/pFI38/46aaP2B/P1A y D7/pFI38/49aaP1A/P2B, y se determinó si el tiempo de generación de éstas variaba con relación a los controles. La expresión de los genes quiméricos en estas cepas hace que en el tallo estén presentes 4 proteínas ácidas, pero sólo tres tipos de dominios carboxilo-terminales. En el caso de la cepa D5 habrá un carboxilo de tipo P2α, uno tipo P1β y dos de tipo P1α. Por otro lado, en el caso de la cepa D7 el tallo estará compuesto por dos carboxilos de tipo P2β, uno de tipo P1β y otro tipo P2α (fig. III. 27). Según el caso, las cepas D5/P2βc100his6 y D7/P1αc96his6 sirvieron como controles, así como la cepa W303 y las cepas D5 y

D7 sin transformar. En las cepas D5/P2 β c100his6 y D7/P1 α c96his6 el tallo ribosómico tiene 4 proteínas ácidas y 4 dominios carboxilo-terminales diferentes, de las cuales una porta las mismas modificaciones en el extremo carboxilo que están presentes en las quimeras. La presencia de la cola de 6 histidinas presente en las proteínas control P1 α y P2 β y en las quimeras, hace que el crecimiento de las cepas que las expresan sea más lento que el de las cepas que expresan las mismas proteínas que no tienen este epítipo. El retardo es de aproximadamente 20 minutos.

En las figuras III.28 y III.29 están representadas las curvas de crecimiento obtenidas en las que se puede apreciar que en ningún caso, el tiempo de generación de las cepas que expresan las quimeras varía en relación con las cepas controles que expresan las proteínas P2 β c100his6 y P1 α c96his6. En estas cepas la actividad del tallo que tiene sólo tres tipos de dominios carboxilo-terminales parece ser la misma que la de del control con cuatro regiones carboxilo-terminales diferentes.

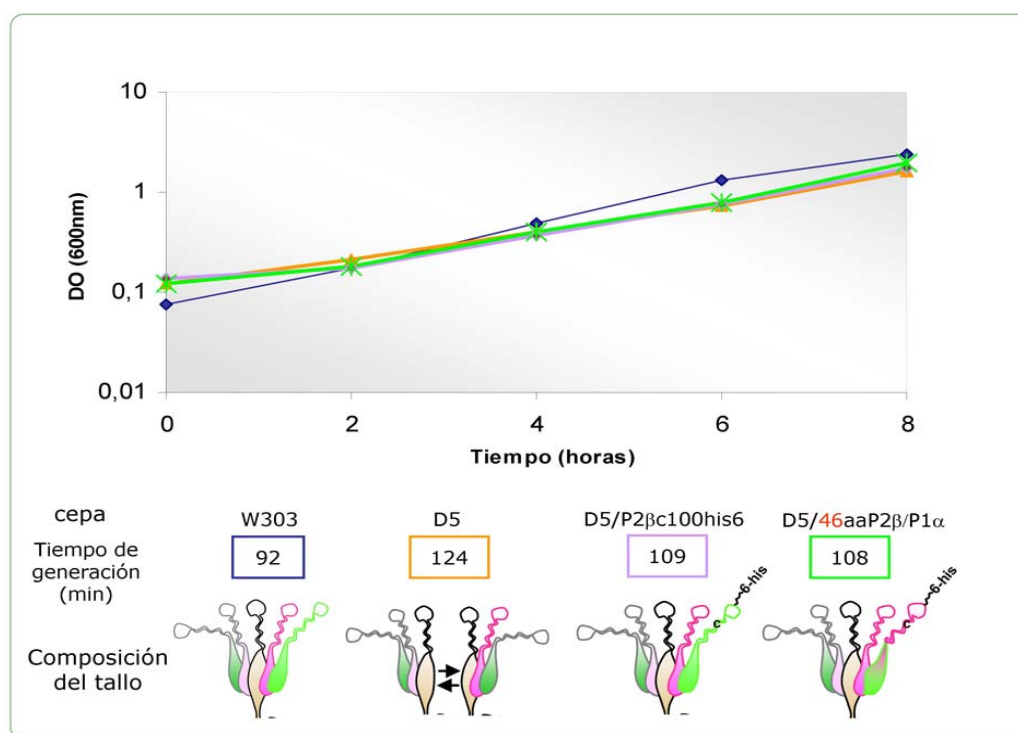


Fig. III.28: Curva de crecimiento en medio YPD de las cepas D5/pFl38/46aaP2B/P1A, W303, D5/pfl38/P2 β c100-his6 y D5 sin transformar. En la parte inferior de la figura se muestra el tiempo de generación y la composición del tallo ribosómico de cada cepa.

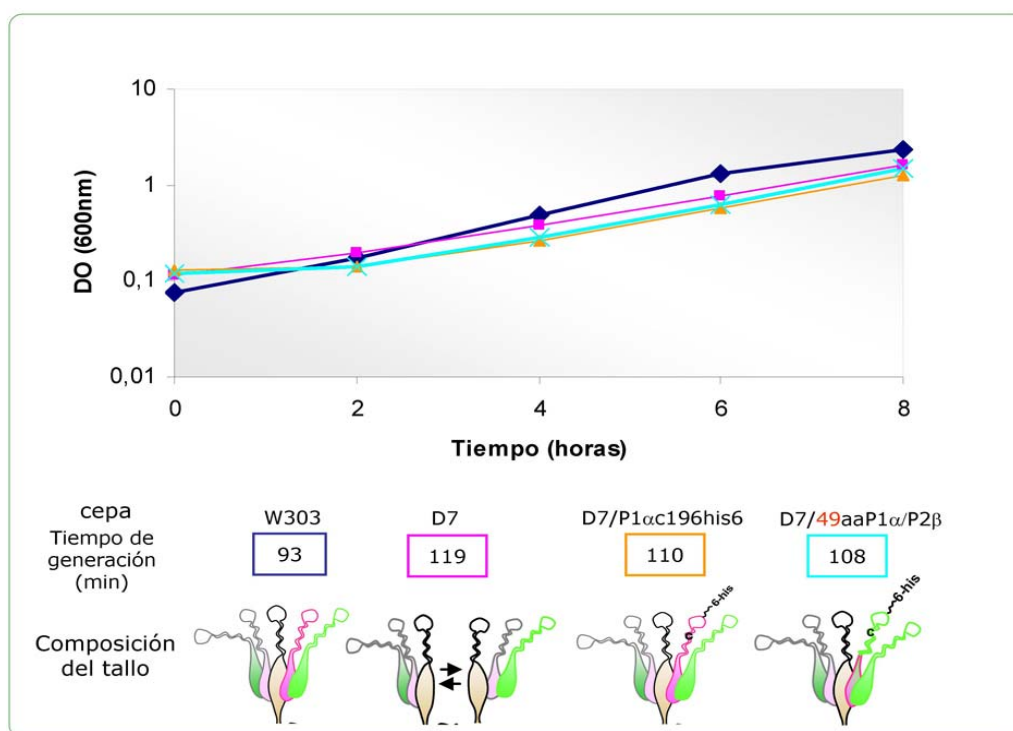


Fig. III.29: Curva de crecimiento en medio YPD de las cepas D7/pFI38/49aaP1A/P2B, W303, D7/pFI38/P1 α c96-his6 y D7 sin transformar. En la parte inferior de la figura se muestra el tiempo de generación y la composición del tallo ribosómico de cada cepa.

III.4.2. Efecto de la expresión de las proteínas 46aaP2 β /P1 α y 49aaP1 α /P2 β en cepas de levadura carentes de dos proteínas ácidas.

Es muy probable que cuando haya menos de cuatro proteínas ácidas en el ribosoma, el efecto que puede ejercer la presencia de dos extremos carboxilo-terminales en el tallo sobre el tiempo de generación, sea más acusado. Basados en esta hipótesis, decidimos determinar el tiempo de generación de las cepas D45/pFI38/46aaP2B/P1A y D67/pFI38/49aaP1A/P2B.

Como se menciona en el apartado III.2.2.1., en la población total de los ribosomas de la cepa D45/pFI38/46aaP2B/P1A van a existir dos grupos, uno en donde el tallo porta la proteína P1 β y la quimera y otro grupo en cuyo tallo están presentes la quimera y la proteína P1 α . En ambos casos cada ribosoma tendrá sólo dos proteínas y los dominios carboxilos-terminales serán de tipo P1. Los controles para estos ensayos fueron la cepa silvestre W303, la cepa D45 sin transformar y transformada con el vector pFI38/P2 β c100his6. Al observar las

curvas de crecimiento realizadas, se puede apreciar que no hay diferencias significativas entre el tiempo de generación de la cepa D45/pFI38/P2 β c100his6 y la cepa D45/pFI38/46aaP2B/P1A (fig. III.30). Este resultado indica que la actividad de un tallo que contiene un extremo carboxilo de tipo P2 β -P1 (control) es equivalente a la actividad de un tallo en donde están presentes dos regiones carboxilo de tipo P1; al menos en el caso de la quimera seleccionada.

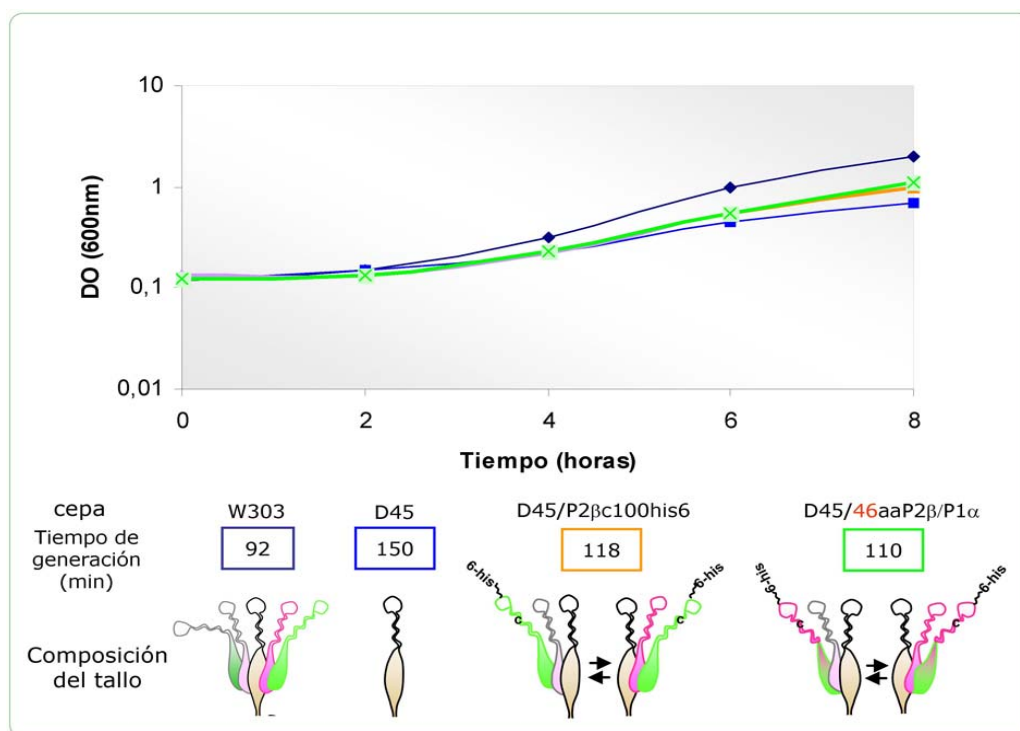
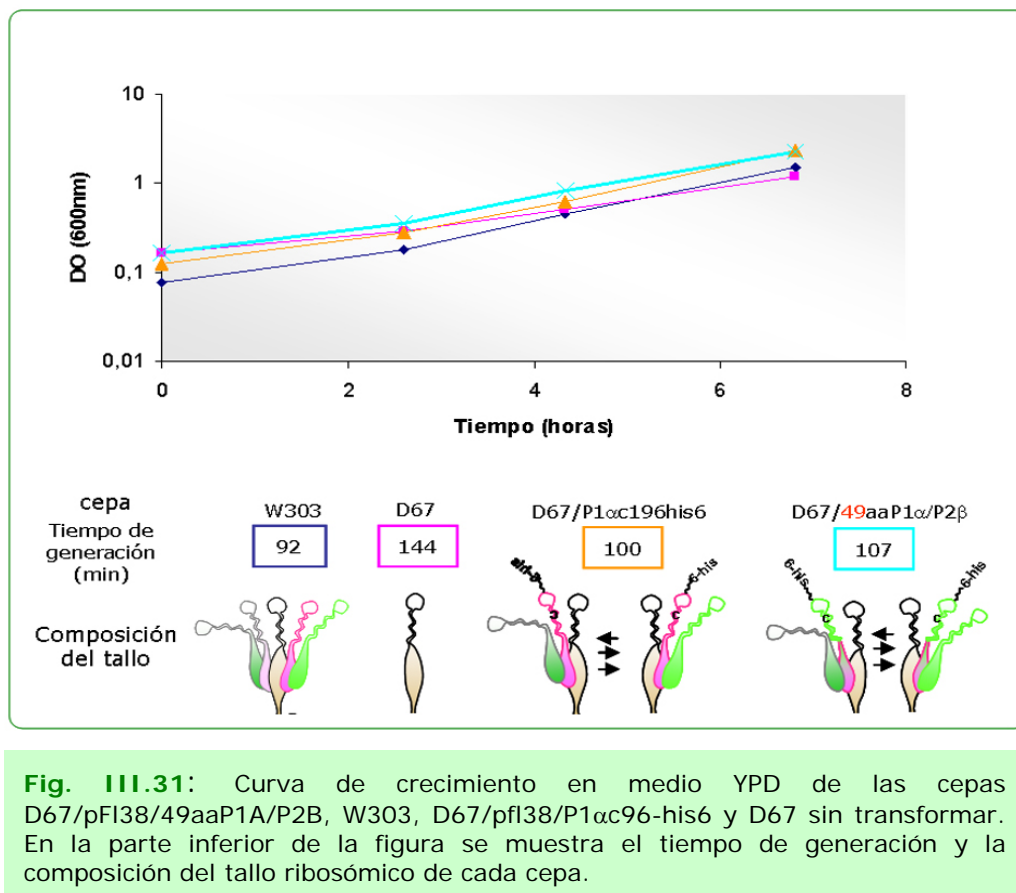


Fig. III.30: Curva de crecimiento en medio YPD de las cepas D45/pFI38/46aaP2B/P1A, W303, D45/pFI38/P2 β c100-his6 y D45 sin transformar. En la parte inferior de la figura se muestra el tiempo de generación y la composición del tallo ribosómico de cada cepa.

El análisis mediante isoelectroenfoque de ribosomas de la cepa D67/pFI38/49aaP1A/P2B mostró que la proteína P2 β está en mayor proporción que la proteína P2 α (fig. III.17), por tanto, aunque haya dos poblaciones de ribosomas, una con la quimera y la proteína P2 α y otra con la proteína P2 β y la quimera, esta última será la que predomine.

Las curvas de crecimiento realizadas con las cepas D67 revelaron que no hay una diferencia significativa entre el tiempo de generación de la cepa D67/pFI38/49aaP1A/P2B y la cepa D67/pFI38/P1 α c96-his6. Estos resultados indican que la actividad en la célula, de un tallo ribosómico con dos proteínas ácidas con dominios carboxilo-terminales de tipo P2 (predominantemente de tipo

P2 β), es equivalente a la actividad de un tallo compuesto por una proteína ácida con un dominio carboxilo de tipo P1 α y otra con una región carboxilo tipo P2 (predominantemente de tipo P2 β) (FIG. III.31).



III.4.3. Efecto de la expresión de las proteínas 46aaP2 β /P1 α , 64aaP2 β /P1 α , 49aaP1 α /P2 β y 58aaP1 α /P2 β en cepas de levadura carentes de tres proteínas ácidas.

Para evitar la presencia de poblaciones heterogéneas, se estudió el efecto que se produce en el tiempo de generación de cepas de levadura carentes de tres proteínas ácidas que expresan las quimeras seleccionadas. Una vez que las cepas D456 y D467 son transformadas con los plásmidos pFI38/46aaP2B/P1A y pFI38/49aaP1A/P2B, respectivamente, en el tallo de estas cepas estarán presentes sólo dos proteínas, pero a diferencia de lo que ocurre cuando se transforman las cepas D45 y D67, la población de ribosomas resultante será homogénea en todos

los casos, por lo que el efecto que se produzca sobre la tasa de crecimiento puede ser más fácilmente interpretado.

En la cepa D456/pFI38/46aaP2B/P1A, el tallo ribosómico está compuesto únicamente por las proteínas ácidas P1 α endógena y la quimera. De esta manera, las dos regiones carboxilo presentes en el tallo de todos los ribosomas de la célula son de tipo P1 α . Por otro lado, al expresar la proteína control P2 β c100his6 en la cepa D456 la composición del tallo consiste de dos proteínas ácidas, una con una región carboxilo de tipo P1 α y otra con una de tipo P2 β .

Al analizar el comportamiento de las cepas D456 mediante curvas de crecimiento, se pudo observar que la cepa D456 que expresa la quimera 46aaP2 β /P1 α tiene un tiempo de duplicación sensiblemente menor que el de la cepa control D456/P2 β c100his6 (fig. III.32).

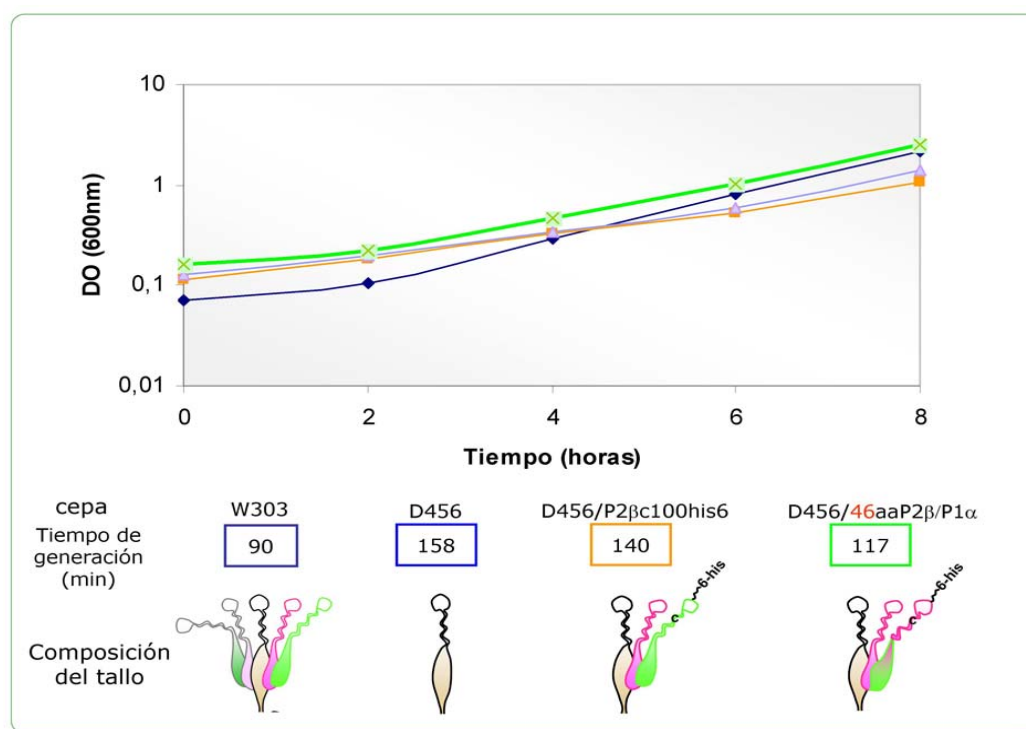


Fig. III.32: Curva de crecimiento en medio YPD de las cepas D456/pFI38/46aaP2B/P1A, W303, D456/pFI38/P2 β c100-his6 y D456 sin transformar. En la parte inferior de la figura se muestra el tiempo de generación y la composición del tallo ribosómico de cada cepa.

Los valores del tiempo de generación obtenidos muestran que la expresión de la proteína P2 β c100his6 en una cepa D456 incrementa su velocidad de crecimiento en un 13%, mientras que la expresión de la proteína 46aaP2 β /P1 α la incrementa en un 26%. La diferencia en el incremento de la velocidad de la cepa

D456 al expresar la proteína control y la quimera, es del 13%, diferencia que entre proteínas cuya secuencias presentan una gran homología, es relativamente significativa.

Este efecto sobre el crecimiento parece indicar que un tallo ribosómico con dos extremos carboxilo de tipo P1 α favorece la eficiencia de la traducción, lo que conlleva a una aceleración del crecimiento. Para comprobar el efecto directo de estos ribosomas en el proceso de traducción, se planteó realizar ensayos de síntesis de proteínas *in vitro*. Para ello, se prepararon ribosomas de la cepa D456/pFl38/46aaP2B/P1A, de la cepa silvestre W303 y de D456/pFl38/P2 β c100his6, y se estudió la actividad *in vitro* de estos ribosomas en un ensayo de síntesis de polifenilalanina. Como fracción soluble se utilizó el extracto S100 de la cepa D4567 (mutante cuádruple, carente de proteínas ácidas), con el cual se evita que se produzca un intercambio entre las proteínas ácidas solubles que puede contener el S100 de cualquier otra cepa que exprese alguno de los genes de las proteínas ácidas y los ribosomas estudiados.

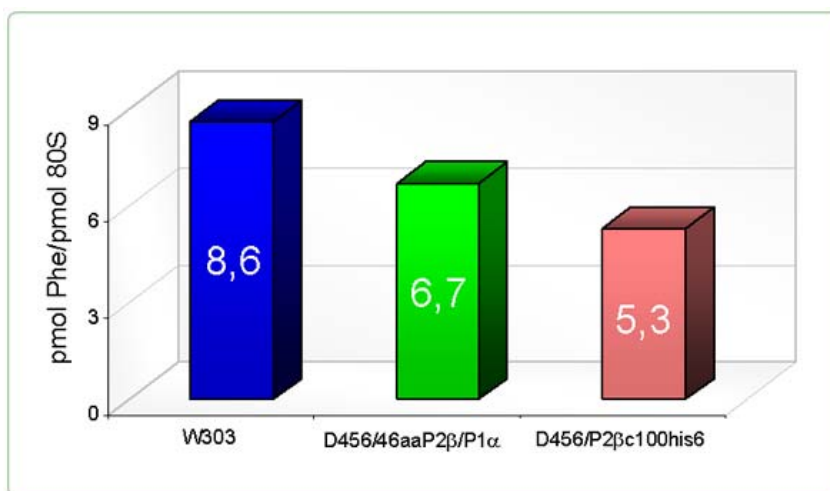


Fig. III.33: Actividad traduccional de la cepa D456/pfl38/46aaP2B/P1A. Actividad polimerizante de fenilalanina de la cepa D456/pfl38/46aaP2B/P1A respecto a la cepa silvestre W303 y a la cepa D456/pfl38/P2 β c100-his6.

Los resultados obtenidos indican que en relación con la cepa control W303, cuyos ribosomas se considera que tienen el 100% de actividad polimerizante, los de la cepa D456/P2 β c100his6 presentan una actividad del 62%, mientras que los de la cepa D456/46aaP2 β /P1 α tienen una actividad del 78% (fig. III.33). Los resultados demuestran que sí existe una relación directa entre la aceleración del

crecimiento y el aumento de la eficiencia de la síntesis de proteínas en la cepa D456/pfl38/46aP2B/P1A.

A la vista de estos resultados, se planteó analizar el efecto que se produce al expresar en una cepa D456, una quimera con una región carboxilo-terminal de P1 α más pequeña que la que tiene la proteína 46aaP2 β /P1 α (57 aminoácidos de P1 α , del aminoácido 50 al 110). Para ello, se escogió la construcción que expresa la quimera 64aaP2 β /P1 α , que tiene los últimos 48 aminoácidos de P1 α (del aminoácido 59 al 100) (fig. III.26). Al estudiar la cepa D456/pfl38/64aaP2B/P1A en curva de crecimiento, se encontró que su tiempo de generación es muy semejante al tiempo de duplicación de la cepa control D456/pfl38/P2 β c100his6 (fig. III.34).

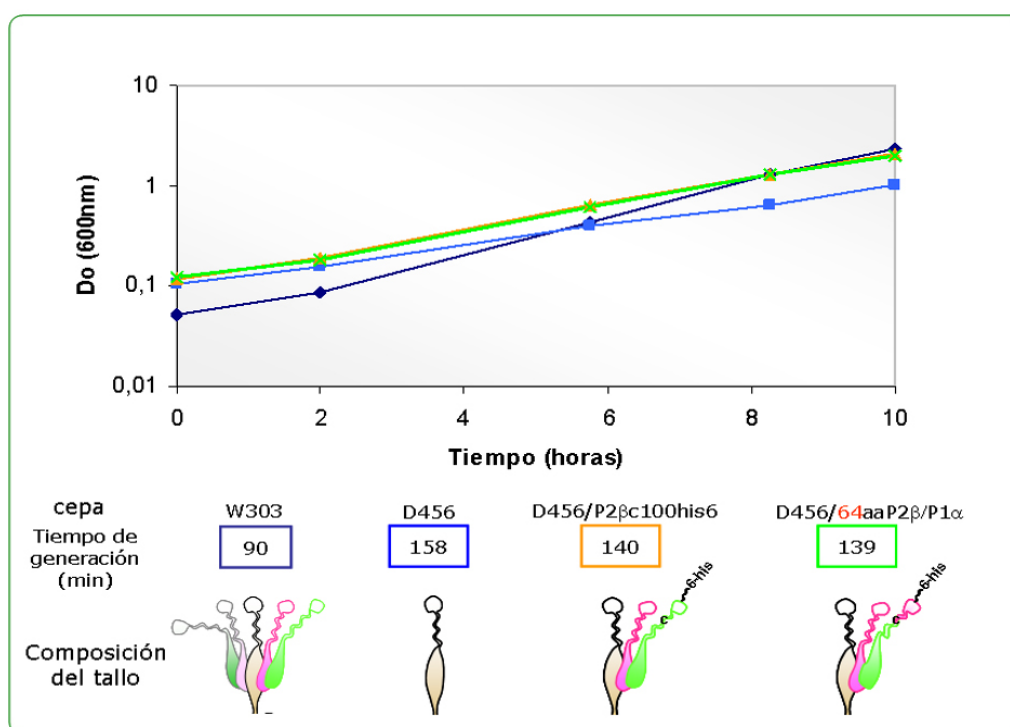


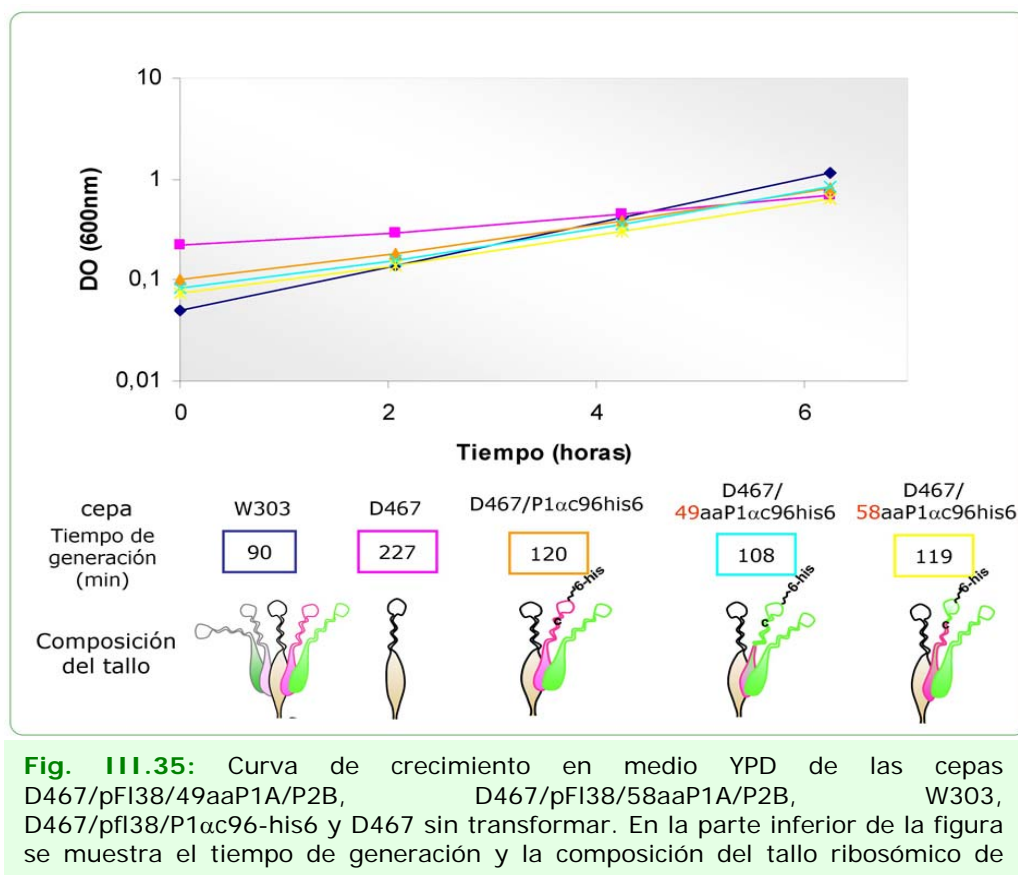
Fig. III.34: Curva de crecimiento en medio YPD de las cepas D456/pfl38/64aaP2B/P1A, W303, D456/pfl38/P2 β c100his6 y D456 sin transformar. En la parte inferior de la figura se muestra el tiempo de generación y la composición del tallo ribosómico de cada cepa.

Este resultado indica que la presencia de la región comprendida entre el aminoácido 46 y 64 la proteína P2 β en una proteína quimérica tipo P2 β /P1 α determina que ésta se comporte funcionalmente como una proteína P2 β completa. Por otro lado, según estos resultados, la región comprendida entre los

aminoácidos 50 y 59 de P1 α es crítica en la determinación de la especificidad funcional de esta proteína.

Para estudiar la actividad de un tallo ribosómico cuya composición en proteínas ácidas sea únicamente de dos proteínas que tengan dominios carboxilo-terminales de tipo P2 β , es necesario disponer de una cepa de levadura que solamente exprese la proteína P2 β . En nuestro laboratorio no disponíamos de una cepa con estas características, por lo que se decidió obtener una cepa D467 (carente de P2 α y de proteínas P1 α y P1 β). Con este fin, se interrumpió el gen RPP1B, que codifica la proteína P1 β , en la cepa D47 utilizando un módulo de reemplazamiento génico obtenido previamente en nuestro laboratorio (apartado VI.5.2.1.).

Con el objetivo antes mencionado, la cepa D467 obtenida, se transformó con la construcción pFI38/49aaP1A/P2B, con el plásmido pFI38/P1 α c96-his6 como control y con la construcción pFI38/58aaP1A/P2B. Se decidió utilizar esta última construcción con la finalidad de determinar, al igual que se hizo en la cepa D456, si pequeñas diferencias de secuencias en el dominio carboxilo-terminal produce un efecto diferente sobre el tiempo de generación. Al expresar la proteína P1 α c96his6 en la cepa D467, el tallo está compuesto por dos proteínas, pero tiene dos regiones carboxilo-terminales diferentes, una de tipo P2 β y otra de tipo P1 α . En el caso de las cepas D467/pFI38/49aaP1A/P2B y D467/pFI38/58aaP1A/P2B, todos los ribosomas tendrán un tallo cuya composición consiste de dos proteínas ácidas con dos regiones carboxilo de tipo P2 β , uno aportado por la quimera y otro perteneciente a la proteína P2 β endógena. En el primer caso, la región de P2 β presente en la región carboxilo-terminal de la quimera es de 64 aminoácidos (del aminoácido 47 al 110), mientras que en el caso de la proteína 58aaP1 α /P2 β es de 46 aminoácidos (del aminoácido 65 al 110).



En las curvas de crecimiento representadas en la figura III.35 se puede observar que el crecimiento de la cepa D467/pF138/49aaP1A/P2B es ligeramente más acelerado que el crecimiento de la cepa control D467/pF138/P1αc96his6, mientras que el de la cepa D467/pF138/58aaP1A/P2B es prácticamente el mismo. El análisis de estos datos muestra, que la expresión de la proteína P1αc96his6 acelera el crecimiento de la cepa D467 en un 47%, mientras que el efecto de la expresión de la proteína 49aaP1α/P2β es ligeramente más pronunciado, sólo un 5% más que en el control D467/pF138/P1αc96his6. Por otro lado, la expresión de la proteína 58aaP1α/P2β en la cepa D467 produce una aceleración del 48% con relación a la cepa D467, el mismo efecto sobre el tiempo de generación que ejerce la expresión de la proteína P1αc96his6.

Estos datos indican que en una célula donde todas las partículas ribosómicas tienen un tallo con dos extremos carboxilo de tipo P2β, los ribosomas son ligeramente más eficientes que los de una célula, donde todos sus ribosomas tienen un tallo compuesto por un carboxilo tipo P1α y otro tipo P2β. Las diferencias observadas entre la expresión de la proteína 49aaP1α/P2β y la proteína

58aaP1 α /P2 β , indican que la región de P2 β comprendida entre el aminoácido 47 y 65, no determina prácticamente ninguna diferencia funcional. Además, el hecho de que la cepa D467/pFI38/58aaP1A/P2B tenga un tiempo de duplicación prácticamente idéntico al de la cepa D467/pFI38/P1 α c96his6, indica que la región de P1 α comprendida entre el aminoácido 49 y el 58 es la que determina que la proteína se comporte funcionalmente como una P1 α silvestre.

Discusión

Los ribosomas de todos los dominios de la vida tienen en la subunidad mayor una protuberancia lateral denominada tallo. Éste es un complejo proteico universalmente conservado y un dominio esencial en la función del ribosoma. El tallo ribosómico tiene un papel central en el reclutamiento de factores de traducción y en la estimulación de la actividad de GTPasa de los factores GTPasa-dependientes durante la síntesis de proteínas (Liljas, 2004).

En la mayor parte de los organismos el tallo ribosómico está formado por un complejo pentamérico de proteínas, constituido por una proteína central (L10 en procariotas, P0 en eucariotas) que se ancla al ARNr por su dominio amino-terminal y que interacciona a través de su dominio carboxilo-terminal con cuatro proteínas de carácter muy ácido. Mientras que en procariotas existe un solo tipo de proteína ácida, L7/L12, en forma de homodímeros, en organismos eucariotas existen dos familias, las fosfoproteínas P1 y P2, que se ensamblan al tallo ribosómico en forma de heterodímeros (Tchorzewski y col., 2000), siendo la proteína P1 la que media esta unión (Gonzalo y col., 2001). En la levadura *S. cerevisiae* hay dos miembros de cada familia, P1 α -P1 β y P2 α -P2 β (Newton y col., 1990), que se asocian al ribosoma formando pares preferentes, P1 α /P2 β y P1 β /P2 α (Guarinos y col., 2001; Lalioti y col., 2002; Krokowski y col., 2006),

La existencia de dos familias de proteínas ácidas en eucariotas hace pensar que puede haber una especialización en las funciones de estas proteínas; de hecho algunos estudios así lo señalan (Zurdo y col., 2000; Qiu y col., 2006). Sin embargo, no hay suficiente información acerca de las diferentes funciones que pueden desempeñar los dos tipos de proteínas (P1/P2) en la actividad del tallo ribosómico, así como tampoco sobre cómo se relacionan entre ellas.

Los experimentos presentados en esta memoria fueron diseñados para explorar estas diferencias y dilucidar qué elementos estructurales son los responsables de la especialización funcional de las proteínas ácidas de *S. cerevisiae*. Para alcanzar este objetivo, se construyeron diferentes proteínas quiméricas entre las proteínas P1 α y P2 β . El diseño de las quimeras se ha basado en la estructura secundaria de las proteínas (fig. III.1), de esta manera se ha podido relacionar más fácilmente la función con la estructura de los diferentes dominios.

Los ensayos realizados con estas quimeras han permitido acotar las regiones de las proteínas P1 α y P2 β involucradas en la unión al ribosoma y en la interacción que se produce entre ellas, así como establecer diferencias funcionales entre los dominios carboxilo-terminales de estas proteínas.

IV.1. Estabilidad de las proteínas quimeras obtenidas.

Antes de realizar los experimentos que nos habíamos propuesto para alcanzar nuestros objetivos, se comprobó que las proteínas quiméricas se expresaban adecuadamente. Utilizando la técnica de *Western* se determinó que todas las quimeras se expresaban y que eran estables en la célula, a excepción de las proteínas 15aaP1 α /P2 β y 19aaP2 β /P1 α ; la primera no fue detectada y la segunda se detectó en muy poca cantidad. Mediante análisis de *Northern* se determinó que el ARNm de la proteína 15aaP1 α /P2 β era estable, y aunque no se ha demostrado experimentalmente, es muy improbable que el mensajero no se traduzca ya que todas las construcciones se hicieron siguiendo la misma estrategia y utilizando los mismos genes. Por tanto, probablemente la ausencia de la proteína 15aaP1 α /P2 β se deba a que esta proteína es susceptible de degradación. Esta conclusión la confirman datos previos que demuestran como P2 β , normalmente estable en el citoplasma cuando no esta unida al ribosoma, era susceptible de degradarse cuando los 10 primeros aminoácidos de su secuencia eran reemplazados por los aminoácidos equivalentes de P1 β (Nusspaumer y col., 2000). Dada la elevada homología que existe entre los 15 primeros aminoácidos de P1 β y P1 α (fig. I.3), se puede esperar que los primeros aminoácidos de la secuencia de P1 α ejerzan el mismo efecto sobre P2 β , aumentando su susceptibilidad a la degradación.

Por el contrario, la poca cantidad de la quimera 19aaP2 β /P1 α observada en el extracto S30 es inesperada, ya que anteriormente se ha observado que una proteína P1 β que porta los primeros 10 aminoácidos de P2 β , es resistente a la degradación (Nusspaumer y col., 2000). Quizás, la combinación de las regiones de P1 α y P2 β presente en esta quimera en concreto, da lugar a una secuencia que inestabiliza la proteína haciéndola mas susceptible a la acción de algunas proteasas.

IV.2. Identificación de la región mínima necesaria para que las proteínas P1 α y P2 β se unan de forma estable al ribosoma.

La información disponible acerca de la implicación del dominio amino-terminal de las proteínas P1/P2 en la unión al ribosoma es bastante escasa. El primer estudio donde se relacionó este dominio con la unión al ribosoma fue llevado a cabo con las proteínas de *S. cerevisiae* (Jose y col., 1995). Posteriormente, se han realizado estudios con proteínas ácidas de otros organismos eucariotas en los que se ha confirmado que efectivamente este dominio es el responsable de la unión de las proteínas ácidas al ribosoma. Experimentos de solubilización de proteínas realizados con proteínas P1 y P2 truncadas de rata demostraron que el dominio amino-terminal de P1 (primeros 63 aminoácidos) interacciona con la proteína P0 y con el dominio amino-terminal de P2 (primeros 65 aminoácidos) (Gonzalo y col., 2001). En otro estudio, publicado muy recientemente, en donde se utilizaron proteínas P1 y P2 truncadas de *B. mori*, se llegó a la conclusión de que la eliminación de los primeros 10 aminoácidos de cada proteína inhibe su unión a la proteína P0 (Naganuma y col., 2007). En nuestro laboratorio, se ha determinado que la secuencia de los primeros 5 aminoácidos de las proteínas P1 β y P2 β es determinante para su unión al ribosoma (Nusspaumer, G.; resultados no publicados). Todos estos estudios aportan datos acerca de la unión de las proteínas ácidas al tallo ribosómico, pero aún no se ha delimitado con exactitud la región mínima necesaria del dominio amino-terminal de las proteínas P1/P2 que determina su unión tallo ribosómico.

El estudio mediante *Western* de los ribosomas de las cepas de levadura disruptantes en proteínas ácidas que expresaban las proteínas quiméricas construidas en este trabajo, permitió precisar la región necesaria para que las proteínas P1 α y P2 β puedan unirse firmemente a la partícula ribosómica.

El análisis de los ribosomas de las cepas D7 (carente de P1 α) y de las cepas D67 (carente de P1 α y P1 β) que expresan las proteínas de la serie P1 α /P2 β mostró, que sólo las proteínas 40aaP1 α /P2 β , 49aaP1 α /P2 β , 53aaP1 α /P2 β y 58aaP1 α /P2 β son capaces de unirse a los ribosomas crudos; si bien, únicamente las proteínas 49aaP1 α /P2 β , 53aaP1 α /P2 β y 58aaP1 α /P2 β permanecen unidas a los ribosomas purificados, unión que es equivalente a la de la proteína P1 α nativa. Estos resultados señalan que la unión de la proteína 40aaP1 α /P2 β al ribosoma es

lábil, lo que indica que la región necesaria para que P1 α se una de forma estable al tallo ribosómico incluye los primeros 49 aminoácidos de su DAT, secuencia que incluye a las tres primeras α -hélices de P2 β

Por otro lado, los resultados obtenidos con las proteínas de la serie P2 β /P1 α , expresadas tanto en la cepa D5 (carente de la proteína P2 β) como en la cepa D45 (carente de P2 α y P2 β), demostraron que en ribosomas purificados la proteína P2 β puede unirse de forma estable al ribosoma siempre y cuando esté presente un fragmento que incluya, al menos, los primeros 46 aminoácidos de su región amino-terminal; secuencia que igualmente corresponde a las tres primeras α -hélices de P2 β (fig. III.1). En la misma fracción ribosómica, la proteína 35aaP2 β /P1 α se detectó en muy poca cantidad, lo que demuestra que la presencia de sólo 35 aminoácidos de P2 β no son suficientes para estabilizar la unión de esta proteína al tallo.

En términos de estructura secundaria, los resultados obtenidos con ambas series de quimeras permiten concluir que para que se produzca la unión de las proteínas ácidas al tallo ribosómico es necesaria la presencia de las α -hélices H1, H2 y H3 existentes en el DAT de todas ellas (fig. III.1), aunque H3 podría ser parcialmente prescindible al menos para una interacción débil. Estas tres hélices parece que forman un dominio estructural bien definido e independiente del resto de la proteína en cuanto al ensamblaje del tallo ribosómico se refiere.

En bacterias, la zona de interacción de la proteína equivalente, L7/L12, con el ribosoma esta formada por una horquilla de sólo dos α -hélices que en la forma funcional dimérica de la proteína se disponen en dos horquillas antiparalelas formando un haz simétrico de 4 α -hélices entre los dos monómeros (Wahl y col., 2000; Bocharov y col., 2004), el cual interacciona con otra α -hélice de la proteína L10 dando lugar a un complejo extraordinariamente estable (Diaconu y col., 2005).

El mecanismo de interacción de las proteínas eucarióticas ácidas P1 y P2 con P0 para formar el tallo no esta suficientemente aclarado. La formación de heterodímeros P1-P2 parece necesaria en condiciones normales, pero no hay datos experimentales que demuestren que, como en el caso bacteriano, la interacción tiene lugar a través de una estructura en la que interviene el DAT de

las dos proteínas. Existen, sin embargo, datos que son compatibles con que la interacción del heterodímero tiene lugar a través de las proteínas de tipo P1 (Gonzalo y col., 2001).

En cualquier caso, nuestros datos sugieren que la evolución ha añadido una tercera hélice a la estructura que determina el ensamblaje de las proteínas ácidas, cuya función en este caso ha sido disminuir la estabilidad del complejo, ya que el tallo eucariótico, como se ha indicado en la introducción, es mucho menos estable que el procariótico, lo que facilita el proceso de intercambio entre las proteínas libres y las unidas al ribosoma detectado en células eucarióticas (Ballesta y Remacha, 1996).

IV.3. Análisis de las interacciones de las proteínas quiméricas con las proteínas ácidas endógenas.

En la levadura *S. cerevisiae* se ha establecido que las proteínas ácidas se asocian al tallo formando los pares preferentes $P1\alpha$ - $P2\beta$ y $P2\alpha$ - $P2\beta$, aunque en algunos estudios también se han detectado heterodímeros tipo $P1\beta$ - $P2\beta$ y $P1\alpha$ - $P2\alpha$ en el ribosoma (Remacha y col., 1992). También se ha especulado sobre la formación de homodímeros, sin embargo, ninguno de los estudios realizados ha sido concluyente al respecto (Tchorzewski, y col., 2000; Lalioti y col. 2002). En cuanto a la disposición de estas proteínas en el tallo, se ha propuesto un modelo en el cual las proteínas P1 establecen una interacción directa con la proteína P0, mientras que las proteínas P2 sólo interaccionan con las proteínas P1; de esta manera las proteínas P2 quedan más expuestas al citoplasma y las P1 quedan localizadas más internamente (Gonzalo y col., 2001; Qiu y col., 2006). Basándonos en este modelo, el estudio de la unión al ribosoma de las proteínas quiméricas construidas en este trabajo, nos ha permitido profundizar en el conocimiento de cómo las proteínas ácidas se relacionan entre sí en el tallo ribosómico.

Como se ha mencionado anteriormente, en el estudio de las cepas D7 y D67 que expresan las proteínas quiméricas $P1\alpha$ / $P2\beta$, se encontró que en los ribosomas (crudos y purificados) de ambas cepas, se unen las mismas proteínas quiméricas, lo que indica que dicha unión es independiente del número de proteínas ácidas presentes en el tallo ribosómico, y que la ausencia de $P1\beta$ no

afecta la afinidad de unión de la proteína P1 α a su sitio específico (D67). Por otro lado, en el estudio de la unión de la serie de quimeras P2 β /P1 α al ribosoma, se observó que si bien, tanto en los ribosomas purificados de la cepa D5 como en los de la cepa D45, únicamente se unen las quimeras que tienen los fragmentos más largos de la proteína P2 β en el DAT, en los ribosomas crudos de la cepa D5 aparecen unidas todas las proteínas de la serie. De estos resultados se deduce, que probablemente el heterodímero P1 β /P2 α o alguna de las dos proteínas que lo componen, presentes únicamente en la cepa D5, facilita la asociación de las quimeras P2 β /P1 α , incluso de la que sólo contiene los primeros 12 aminoácidos de P2 β .

El análisis mediante isoelectroenfoque de los ribosomas purificados de las cepas D67 y D45 que expresan proteínas quiméricas, reveló que la composición en proteínas ácidas del tallo es dependiente de la proteína quimera expresada.

En los ribosomas de la cepa D67 que expresa la proteína 40aaP1 α /P2 β , que se une débilmente al ribosoma, sólo se detectó la proteína quimérica. Este inesperado resultado es contrario a los estudios *in vivo* que se han realizado sobre la unión de las proteínas P1/P2 al ribosoma, que señalan que el tallo debe estar compuesto por al menos una proteína de tipo P1 y otra de tipo P2 (Remacha y col., 1992). Una posible explicación, es que monómeros de esta quimera en concreto, incapaces de interaccionar de forma estable con las proteínas P2, interaccionan entre sí formando homodímeros adoptando una conformación que probablemente le aporta una mayor estabilidad a la proteína y le permite asociarse al tallo ribosómico. Esta situación no se produce en ribosomas que contienen a las proteínas quiméricas 49aaP1 α /P2 β , 53aaP1 α /P2 β y 58aaP1 α /P2 β , donde además de la quimera también se observa la presencia de proteínas P2 unidas al ribosoma, si bien la proporción y cantidad de éstas varía según la quimera que se exprese. En todos los ribosomas, la proteína P2 β está en mayor proporción que la proteína P2 α , y la cantidad de ambas se incrementa conforme la región amino-terminal de la proteína P1 α que está presente en la quimera es más extensa, siendo en los ribosomas de las cepas que expresan las proteínas 53aaP1 α /P2 β y 58aaP1 α /P2 β en donde la proteína P2 β se une en la misma cantidad que en la cepa control que expresa la proteína P1 α nativa. A la vista de estos resultados, y considerando que se ha descrito que las proteínas P1 sirven de anclaje para las proteínas P2, se puede concluir que la región comprendida entre

la posición 49 y la 53 del DAT de P1 α permite una estabilización adicional de la unión de la proteína P2 β . Por otra parte, el hecho de que en los ribosomas de estas cepas haya más cantidad de proteína P2 β que de P2 α , confirma que en ausencia de la proteína P1 β , la proteína P1 α se une preferentemente a la proteína P2 β .

En el análisis mediante IEF de los ribosomas purificados de las cepas D45 que expresan las quimeras P2 β /P1 α , se encontró que en los ribosomas de la cepa que expresa la quimera 35aaP2 β /P1 α no hay proteínas ácidas, las cuales sí se detectan en los ribosomas de las cepas que expresan las proteínas 46aaP2 β /P1 α , 51aaP2 β /P1 α y 64aaP2 β /P1 α . Hay que hacer notar, que en estos ribosomas aparecen unidas tanto P1 α como P1 β . De estos resultados se puede deducir, por lo tanto, que la presencia de al menos los primeros 46 aminoácidos del DAT de P2 β es necesaria para que esta proteína interactúe tanto con la proteína P1 α como con la proteína P1 β , asociaciones que le permite unirse al ribosoma.

En conjunto, estos resultados indican, que las proteínas ácidas no comparten el mismo patrón de asociación en el tallo ribosómico. La proteína P1 α parece ser más selectiva, ya que en ausencia de la proteína P1 β , se une preferentemente a la proteína P2 β ; mientras que la proteína P2 β , en ausencia de la proteína P2 α , no discrimina y se une por igual a las proteínas P1 α y P1 β . Este comportamiento de las proteínas P1 α y P2 β en ausencia de las proteínas P1 β y P2 α , respectivamente, ha sido observado en nuestro laboratorio en ensayos de doble-híbrido (Francisco, R.; resultados no publicados).

IV.4. Interacción entre las proteínas P1 α y P2 β .

En bacterias se dispone de información detallada acerca del papel que cumple el dominio amino-terminal de la proteína L7/L12 en el proceso de dimerización. Mediante RMN y difracción de rayos-X se resolvió la estructura del dominio amino-terminal de la proteína L7/L12, y se pudo determinar que dos proteínas L7/L12 se unen formando dímeros que comprometen a los primeros 32 aminoácidos del DAT, los cuales, como se ha comentado previamente, se disponen en dos horquillas antiparalelas que forman el sitio de unión a la proteína L10 (Bocharov y col., 2004; Diaconu y col., 2005) (fig. IV.1).

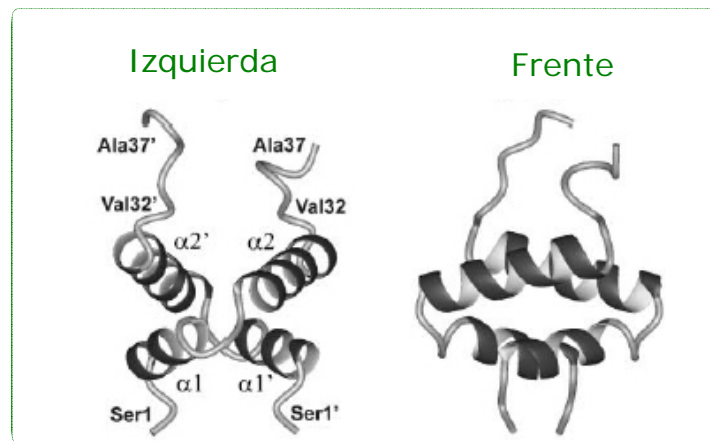


Fig. IV.1: Representación del dominio amino-terminal de la proteína L7/L12. El DAT de L7/L12, que compromete los residuos 1-32, es presentado como un dímero de dos fragmentos N-terminales de L7/L12, Ser1-Ala37 y Ser1'-Ala37'.

En organismos eucarióticos se dispone de poca información sobre la asociación entre las proteínas ácidas. Se ha descrito que la interacción entre las proteínas eucarióticas P1 y P2 se produce por su dominio amino-terminal (Gonzalo y col., 2001; Naganuma y col., 2007). Recientemente, se ha publicado un estudio en donde el heterodímero P1 α -P2 β de *S.cerevisiae* ha sido analizado por RMN y dicroísmo circular, y aunque los datos obtenidos no han permitido obtener un modelo de alta resolución de este dímero, los autores han propuesto la existencia de un haz de α -hélices similar al de bacterias, en el cual participan aproximadamente 60 residuos del DAT de las proteínas P1 α y P2 β dispuestos en 8 α -hélices, comprometiendo las primeras 4 α -hélices de cada proteína (Grela y col., 2007).

Con el objetivo de acotar la región involucrada en estas interacciones utilizamos la técnica del doble híbrido analizar la capacidad de interacción de las quimeras P1 α /P2 β y P2 β /P1 α con las proteínas P1 α y P2 β nativas. Del análisis de las interacciones entre la serie P1 α /P2 β y la proteína P2 β se pudo concluir que son suficientes 40 aminoácidos de la secuencia amino-terminal de la proteína P1 α para que pueda interaccionar con P2 β , y que dicha interacción se fortalece cuando están presentes 49 aminoácidos de P1 α . Del mismo modo, de las interacciones de la serie P2 β /P1 α con P1 α se deduce que al menos 46 aminoácidos de la región amino-terminal de P2 β son necesarios para que ésta se asocie a la proteína P1 α .

Como se ha indicado previamente, de acuerdo con la predicción de la estructura secundaria de las proteínas P1 α y P2 β utilizada, los primeros 49 aminoácidos de P1 α así como los 46 de P2 β incluyen las tres primeras α -hélices (H1, H2 y H3) de ambas proteínas, mientras que los primeros 40 aminoácidos de P1 α corresponden a una región que va desde la α -hélice H1 hasta la región interhelicoidal i2 (fig. III.1). Sin embargo, dado que la predicción de la estructura secundaria de proteínas tiene un cierto margen de error, especialmente en las zonas de interfase, es posible que el triptófano en posición 40 de P1 α realmente forme parte de la hélice H3. De hecho, así aparecía en otra predicción de la estructura de la proteína P1 α realizada posteriormente a la construcción de los genes de las proteínas quiméricas. Es posible, por lo tanto, que la débil interacción detectada entre la quimera 40aaP1 α /P2 β y P2 β sea debida a la presencia de una α -hélice H3 incompleta. Hay que indicar en este contexto, que un estudio anterior del heterodímero P1 α -P2 β por RMN mostró un cambio en la señal del triptófano 40 de P1 α , que sugiere que este residuo está directamente involucrado en la interacción entre ambas proteínas (Zurdo y col., 2000).

Cuando se estudiaron las series de proteínas quiméricas P1 α /P2 β y P2 β /P1 α con las proteínas nativas no complementarias, es decir P1 α y P2 β respectivamente, no se encontró interacción en ningún caso. Estos resultados son de alguna forma el reverso de los discutidos anteriormente ya que nos indican que basta la sustitución de la primera α -hélice de cada proteína para que la interacción con su pareja no tenga lugar (interacción 12aaP2 β /P1 α con P2 β y 15aaP1 α /P2 β con P1 α). A una conclusión semejante llegaron Naganuma y col. (2007), quienes mediante ensayos de precipitación con GST, encontraron que cuando a las proteínas P1 y P2 de *B. mori* les faltan los primeros 10 aminoácidos, éstas pierden la capacidad de unirse a las proteínas P2 y P1 completas, respectivamente.

Por otra parte, estos resultados negativos indican que, al menos con este sistema, no se detectan interacciones entre las regiones de P1 α presentes en las quimeras P1 α /P2 β y la proteína P1 α nativa, ni entre las regiones de P2 β presentes en las quimeras P2 β /P1 α y la proteína P2 β nativa, lo que señala que no se forman los homodímeros P1 α -P1 α ó P2 β -P2 β en las condiciones ensayadas.

Tomando en cuenta todos estos datos, podemos proponer un modelo en donde el núcleo básico que permite la formación del heterodímero P1 α -P2 β , está

formado por un haz de 6 α -hélices que compromete las 3 primeras α -hélices de cada proteína; si bien, nuestros resultados no descartan la participación de la α -hélice H4 en la dimerización.

IV.5 Relación entre la formación de heterodímeros y su unión al ribosoma.

Los resultados que hemos obtenido en el análisis de las interacciones entre P1 α y P2 β con el sistema de doble-híbrido guardan una estrecha relación con las conclusiones derivadas del estudio de unión al ribosoma. Es evidente que las regiones mínimas necesarias para que las proteínas P1 α y P2 β puedan unirse a la partícula ribosómica son muy similares a las necesarias para que estas proteínas puedan asociarse entre sí. Esta coincidencia indica que los dos hechos están interrelacionados y sugiere, aunque no prueba, que quizás no pueden desligarse; es decir, que la interacción entre P1 α y P2 β sea prerequisite para unirse al ribosoma. Esta hipótesis también ha sido propuesta por Gonzalo y col. (2001), quienes proponen que el heterodímero que ellos han observado que se forma entre las proteínas P1 y P2 de rata se une directamente y no secuencialmente, a la proteína P0.

IV.6. Actividad relativa del dominio carboxilo-terminal de las proteínas P1 α y P2 β .

Si realmente existe alguna diferencia funcional entre las proteínas ácidas, ésta probablemente recaería sobre su DCT que es el responsable de reclutar factores solubles durante la traducción. Para determinar si existe alguna diferencia funcional entre la proteína P1 α y P2 β , las quimeras 49aaP1 α /P2 β y 46aaP2 β /P1 α , que tienen en su DAT la región mínima necesaria para unirse al ribosoma y la región más larga del DCT de la proteína complementaria, se expresaron en cepas de levadura que carecían de una, dos y hasta tres proteínas ácidas. Utilizando la combinación de cepa y quimera adecuada se logró obtener una situación en la que en el tallo ribosómico estaban presentes dos DCT del mismo tipo, y se estudió su efecto sobre el crecimiento celular.

En las células en las que todos los ribosomas tienen dos proteínas ácidas con DCT de tipo P2 β , no se observó un efecto significativo sobre la tasa de crecimiento comparada con la de células control que contiene el par de proteínas

P1 α -P2 β nativas; por el contrario, cuando en el tallo están presente dos DCT de tipo P1 α , el incremento en la velocidad de crecimiento sobre las células que expresan el par de proteínas control fue relativamente importante. Igualmente, se ha comprobado mediante ensayos de síntesis de proteína *in vitro*, que la presencia de dos DCT tipo P1 α en el tallo ribosómico hace que el sistema sea más eficiente que cuando el tallo está compuesto por el heterodímero P1 α -P2 β , que aporta un DCT de cada tipo, lo que confirma la mayor eficiencia de los DCT de las proteínas P1 α . Estos datos muestran que hay una diferencia entre el papel de los DCT de las proteínas P1 α y P2 β en la actividad del tallo ribosómico; la presencia de dos DCT tipo P1 α aumenta la actividad de la maquinaria de traducción, lo que se refleja en un incremento del crecimiento celular. Durante la escritura de esta memoria se ha publicado un estudio en el que, utilizando un sistema heterólogo de síntesis de proteínas compuesto por subunidades 50S de *E. coli* y proteínas P1 y P2 truncadas y quiméricas entre P1/P2 de *B. mori*, se obtuvieron resultados que corroboran estas conclusiones, ya que el sistema es notablemente más activo cuando sólo están presentes los dominios carboxilo-terminales de la proteína P1 (Naganuma y col., 2007).

Es interesante, sin embargo, que cuando se ensaya en el mismo sistema la proteína 64aaP2 β /P1 α , no se manifiesta el mismo efecto estimulador. En la quimera 46aaP2 β /P1 α la secuencia de P1 α corresponde a los aminoácidos 50-106, mientras que en la proteína 64aaP2 β /P1 α están presentes los residuos 59-106, por lo tanto la secuencia comprendida entre los aminoácidos 50 y 58 de P1 α parece estar implicada en el incremento del 16% en la eficiencia de la traducción que hemos observado cuando en el tallo ribosómico estaba presente la proteína 46aaP2 β /P1 α . Ahora bien, si nos centramos en las secuencias de P2 β presentes en las quimeras estudiadas, podemos concluir que la región comprendida entre los aminoácidos 46 y 64 es la que determina que ésta se comporte funcionalmente como una proteína P2 β completa, debido a que el par de proteínas 64aaP2 β /P1 α -P1 α nativa es funcionalmente equivalente al par P1 α -P2 β , en el tallo ribosómico. Una explicación de los resultados podría ser que la región 50-58 aa de P1 α confiere mayor movilidad al DCT, permitiendo que la interacción con los factores de traducción sea más eficiente, y cuando este fragmento es reemplazado por la región 46-64 aa de P2 β , dicha capacidad se ve disminuida. Tanto la secuencia 50-58 aa de P1 α como la 46-64 aa de P2 β , corresponden a la región interhelicoidal i3 y a la α -hélice H4 de cada proteína. Si consideramos la posibilidad de que las α -

hélices H4 de P1 α y P2 β están involucradas en la dimerización, de acuerdo con el modelo propuesto por Grela y col. (2007), es probable que, como se detalla en la Fig IV.2, cuando en el tallo está presente el heterodímero 46aaP2 β /P1 α -P1 α nativa, la región 50-58 de 46aaP2 β /P1 α no interacciona con P1 α , quedando libre y por tanto aporta mayor movilidad al DCT, mientras que en el heterodímero 64aaP2 β /P1 α -P1 α nativa es probable que la región 46-64 aa de 64aaP2 β /P1 α forme parte del dímero lo que le da mayor rigidez al DCT de P1 α .

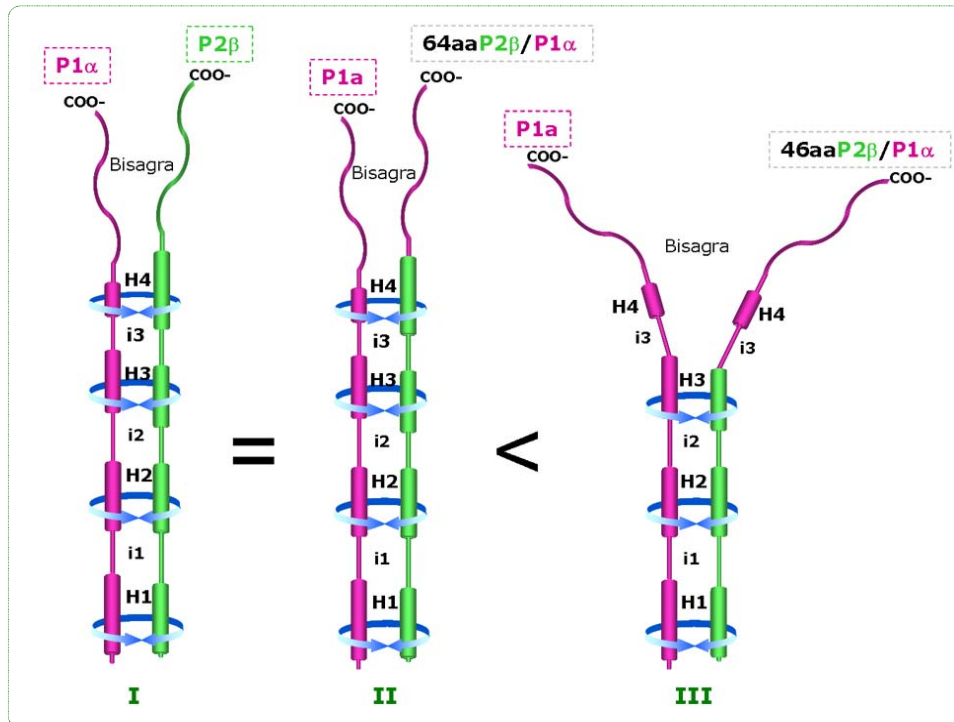


Fig. IV.2: Representación de los dímeros P1 α -P2 β (I), P1 α -64aaP2 β /P1 α (II) y P1 α -46aaP2 β /P1 α (III). Las regiones de la proteína P1 α se representan en fucsia y las de la proteína P2 β en verde. Las flechas azules enlazan a las α -hélices comprometidas en la dimerización. De acuerdo al modelo propuesto, las hélices H4 están comprometidas en la dimerización en I y II, por lo que sus DCT tienen una movilidad restringida, siendo I y II funcionalmente equivalentes; mientras que en III, las H4 están libres y sus DCT tienen mayor movilidad, lo que lo hace más activo que I y II.

Nuestros resultados también permiten establecer diferencias entre las dos proteínas de la familia P1 mostrando que funcionalmente la proteína P1a no es totalmente equivalente a la proteína P1 β . Esta conclusión se deriva de la comparación del tiempo de generación de cepas que bien expresan solo los DCT de P1 α (D456/46aaP2 β /P1 α) o bien los de P1 α y los de P1 β (D45/46aaP2 β /P1 α). En la primera los ribosomas portan un tallo con dos DCT tipo P1 α y en la segunda contienen un tallo mixto, compuesto por un DCT de tipo P1 β y otro de tipo P1 α . Dado que la primera cepa crece mejor que la segunda en relación a sus

respectivos controles, podemos concluir que la síntesis de proteínas es más eficaz cuando los ribosomas están formados por DCT de tipo P1 α . Este resultado puede parecer inesperado considerando la alta homología existente entre P1 α y P1 β que comparten el 77% de su secuencia, sin embargo, la proteína P1 α tiene el pI más bajo de todas las proteínas ácidas de *S. cerevisiae*, y es posible que los residuos ácidos presentes en su secuencia sean los responsables de que pueda interaccionar más eficazmente con los factores de traducción que el resto de las proteínas P1/P2.

Todos estos resultados sugieren que la proteína P1 α es funcionalmente más eficiente que el resto de proteínas ácidas debido, probablemente, a que tienen mayor afinidad por los factores de traducción. Sin embargo, experimentos de entrecruzamiento químico han mostrado que las proteínas de tipo P2 reaccionan con un mayor número de proteínas ribosómicas que las de tipo P1, lo que parece indicar que las proteínas P2 desempeñan una función más activa en el tallo. En principio, estos datos pueden parecer contradictorios, sin embargo, si realmente las proteínas P2 tienen una localización más externa y las P1 están más próximas a la proteína P0, la localización externa posiblemente permite que las proteínas P2 tengan más libertad de movimiento, aunque la afinidad de interacción con las proteínas solubles sea ligeramente inferior al que presenta la proteína P1 α .

Los datos presentados en esta memoria indican claramente que a pesar de su elevada homología estructural, existe una especialización funcional entre las proteínas ácidas del tallo ribosómico, que obviamente debe asociarse a las pequeñas diferencias existentes en las secuencias de sus dominios funcionales.

Conclusiones

1. La región mínima necesaria para que las proteínas P1 α y P2 β se unan de forma estable al ribosoma comprende las tres primeras α -hélices de cada proteína; aminoácidos 1-49 de P1 α y aminoácidos 1-46 de P2 β .

2. En el ribosoma la proteína P1 α interacciona preferentemente con la proteína P2 β a través de los primeros 49 aminoácidos del dominio amino-terminal, mientras que la proteína P2 β interacciona con las proteínas de tipo P1 a través de los primeros 46 aminoácidos del dominio amino.

3. La formación de heterodímeros P1 α -P2 β en solución requiere de al menos los primeros 40 aminoácidos de la secuencia amino-terminal de la proteína P1 α y los primeros 46 aminoácidos de la región amino-terminal de P2 β , si bien dicha interacción es más estable cuando están presentes 49 aminoácidos de P1 α .

4. Las regiones mínimas necesarias de las proteínas P1 α y P2 β para asociarse en heterodímeros y unirse al ribosoma, son las mismas, lo cual indica que ambos procesos están estrechamente relacionados.

5. La formación de homodímeros tipo P1 α -P1 α ó P2 β -P2 β parece ser muy improbable, ya que las regiones amino-terminales de P1 α y P2 β no interaccionan entre sí en las condiciones ensayadas.

6. Las regiones de las proteínas P1 α y P2 β involucradas en la dimerización deben ser continuas, la sustitución de la α -hélice H1 de cada proteína impide que la interacción con su pareja tenga lugar.

7. Los dominios carboxilo-terminales de las proteínas P1 α y P2 β no son totalmente equivalentes a pesar de su elevada homología de secuencia.

8. La secuencia comprendida entre la región interhelicoidal i3 y la α -hélice H4, es importante en la determinación de la función de las proteínas P1 α y P2 β en el tallo.

Materiales y Métodos

VI.1. MATERIAL BIOLÓGICO.

VI.1.1. Cepas de *Escherichia coli*.

Para la amplificación y posterior purificación de los plásmidos pFL y pBDC y sus derivados, se utilizó la cepa de *E. coli* DH5 α (*supE 44* Δ *lac U169* ϕ 80*lacZ* Δ *M15* *hsdR17* *recA1* *endA1* *gyrA96* *thi-1* *relA1*) {Hanahan, 1983 #150}. Las células transformadas portadoras de los plásmidos recombinantes se seleccionaron por resistencia a ampicilina y ausencia de actividad β -galactosidasa.

VI.1.2. Cepas de *Saccharomyces cerevisiae*.

Las cepas de *S. cerevisiae* utilizadas en este trabajo para expresar las proteínas de interés, se detallan en la tabla VI.1.

Tabla VI.1. Cepas de *S. cerevisiae*.

Cepa	Genotipo	Referencia
W303-A	MAT a; <i>ura3, leu2, trp1, his3, ade2 can1</i>	Dr. Slonimski, París
D5	MAT a; <i>ura3, leu2, trp1, his3, ade2, can1, rpp2β::HIS3</i>	{Remacha, 1990 #80}
D7	MAT a; <i>ura3, trp1, his3, ade2, can, rpp1α::LEU2</i>	{Remacha, 1992 #79}
D45	MAT α , <i>ura3, leu2, trp1, his3, ade2, lys2, suc2 rpp2α::loxP, rpp2β::loxP</i>	(Perez-Fernandez, 2003)
D47	MAT a; <i>ura3, leu2, trp1 his3, ade2, rpp2α::URA3, rpp1α::LEU2</i>	(Remacha, 1992)
D67	MAT α ; <i>ura3, leu2, trp1, his3, ade2, can1 rpp1α::LEU2, rpp1β::TRP1</i>	(Remacha, 1992)
D456	MAT a; <i>ura3, leu2, trp1, his3, ade2, can1, rpp2α::URA3, rpp2β::HIS3, rpp1β::TRP1</i>	(Remacha, 1995)
D467	MAT a; <i>ura3, leu2, trp1 his3, ade2, rpp2α::URA3, rpp1α::LEU2, rpp1β::Kan^R:loxP</i>	(Este trabajo)
D4567	MAT α ; <i>ura3, leu2, trp1, his3, ade2, RPP1α::LEU2, rpp1β::TRP1, rpp2α::URA, rpp2β::HIS3</i>	{Remacha, 1995 #60}
Mav203	MAT a; <i>leu2-3,112; trp1-901; his3 Δ200; ade2-101; cyh 2_R; can 1_R; gal4 Δ; gal80 Δ; GAL1::lacZ; HIS3_{UASGAL1}::HIS3 LYS2; SPAL 10 _{UASGAL1}::URA3</i>	(Invitrogen)

VI.2. VECTORES DE CLONACIÓN.

Para la realización de todas las construcciones genéticas, amplificación de fragmentos de ADN por PCR, secuenciación de genes quiméricos y expresión de las proteínas de interés en cepas de levadura, se utilizaron plásmidos centroméricos bifuncionales que permiten seleccionar transformantes en *E. coli* por resistencia a ampicilina y en *S. cerevisiae* por complementación de auxotrofia o por resistencia a geneticina. Los vectores utilizados en este trabajo para tales fines se detallan en la tabla VI.2.

Tabla VI.2. Plásmidos utilizados para la transformación de levadura.

Nombre	Tamaño (Kb)	Características	Referencia
pFL38	4,610	<i>Amp^R, CEN, ARS, URA3</i>	(Bonneaud, 1991)
pFL39	4,357	<i>Amp^R, CEN, ARS, TRP1</i>	(Bonneaud, 1991)
pBDC	8,429	<i>Amp^R, 2μ, TRP1, GAL4BD</i>	(Millson, 2003)
pADC	8,429	<i>Amp^R, 2μ, LEU2, GAL4AD</i>	(Millson, 2003)
PFI38/P1 α c96-his6	5,736	<i>Amp^R, CEN, ARS, URA3, RPP1A</i>	Qiu, 2004
PFI38/P2 β c100-his6	5,630	<i>Amp^R, CEN, ARS, URA3, RPP2B</i>	Qiu, 2004
pADC/P1 α	8,632	<i>Amp^R, 2μ, LEU2, GAL4AD, RPP1A</i>	(Remacha, M., sin publicar)
pADC/P2 β	8,632	<i>Amp^R, 2μ, LEU2, GAL4AD, RPP2B</i>	(Remacha, M., sin publicar)

VI.3. MEDIOS DE CULTIVO.

VI.3.1. Medios de cultivo para *E. coli*.

Para el crecimiento de *E. coli* se utilizó el medio rico LB (bactotripton 1%, NaCl 0,5%, extracto de levadura 0,5%). Para seleccionar transformantes por resistencia a ampicilina, el antibiótico se añadió a una concentración final de 100 μ g/ml. El sustrato X-gal (40 mg/ml) se utilizó para seleccionar los

plásmidos recombinantes por alfa-complementación (debido a la ausencia de la actividad β -galactosidasa). Para el crecimiento en medio sólido se añadió agar a una concentración de 2%.

Los cultivos sembrados en placa se incubaron en estufas a 37°C, y para los cultivos líquidos se usaron baños a la misma temperatura con agitación a 250 rpm. Las cepas de *E. coli* se conservaron por periodos no superiores a un mes a 4 °C en placas de agar con el medio adecuado. Para la conservación durante largos periodos se almacenaron a -80 °C en una solución de glicerol al 15% (v/v).

VI.3.2. Medios de cultivo para *S. cerevisiae*.

Las cepas de *S. cerevisiae* se cultivaron en medio rico YEPD (bactopeptona 2%, extracto de levadura 1%, glucosa 2%). Las cepas portadoras del gen *KanMX4* se seleccionaron en placas de medio YEPD suplementadas con 200µg/ml de geneticina (G-418).

Las cepas transformadas con plásmidos cuyo marcador de selección era un gen de auxotrofia, se seleccionaron en medios selectivos. Para tal fin, se utilizaron los medios de cultivo SC-U y SC-HIS-LEU-TRP, compuestos por base nitrogenada de levadura sin aminoácidos 0,67%, glucosa 2% y los complementos sintéticos SC-U o SC-HIS-LEU-TRP (Bio 101) que son una mezcla de todos los L-aminoácidos necesarios para el crecimiento de *S. cerevisiae* menos los que se indican en cada caso. En el caso de SC-HIS-LEU-TRP, se añadieron los L-aminoácidos requeridos por la cepa a una concentración de 40µg/ml.

Las curvas de crecimiento se hicieron en medio rico YPD a 30 °C con agitación a 200 rpm, utilizando como inóculo un cultivo crecido anteriormente en medio selectivo. A partir de estos cultivos, el crecimiento de cada cepa fue monitoreado mediante la cuantificación de la absorbancia a 600nm. Con los datos obtenidos se graficaron las curvas de crecimiento (absorbancia vs. tiempo) y se determinó el tiempo de generación.

Para el crecimiento en medio sólido se utilizaron los mismos medios de cultivo, a los que se les añadió agar al 2%. Los cultivos se incubaron en estufa a 30°C o en baños a 200 rpm a la misma temperatura. Las cepas de levadura se conservaron por periodos no superiores a dos meses a 4°C en placas de agar con el medio adecuado. Para periodos más prolongados se conservaron a -80°C en una solución de glicerol al 20% (v/v).

VI.4. ENZIMAS, REACTIVOS Y OLIGONUCLEÓTIDOS.

VI.4.1. Enzimas.

Los enzimas de restricción empleados fueron suministrados por la casa comercial MBI Fermentas.

La polimerasa utilizada en las reacciones de PCR fue la *Pwo* DNA polimerasa recombinante (Boehringer Mannheim). Otras enzimas utilizadas fueron: DNA ligasa del bacteriófago T4 (MBI Fermentas), T4 polinucleótido kinasa (MBI Fermentas), fosfatasa alcalina de gamba (Roche), RNasa A (Boehringer Mannheim).

VI.4.2. Reactivos.

Las sales inorgánicas, ácidos, bases y compuestos orgánicos, fueron suministrados por Merck, Sigma y Fluka. Los componentes de los medios de cultivo por Difco y BIO 101.

Otros reactivos usados fueron: β -mercaptoetanol, glicina, formaldehído, acrilamida, bisacrilamida, EDTA, DTT, ADN de esperma de salmón, X-Gal, ampicilina, mezcla de nucleótidos para PCR, BSA, PMSF (Boehringer Mannheim), anfolinas y TEMED (Serva), agarosa, PEG 4000, aminoácidos, nitrato de plata, Tween 20, Tris, SDS, DMSO, leupeptina, aprotinina, pepstatina, bestatina, imidazol, iodoacetamida, o-phenantrolina (Sigma), G418 (Gibco), fenol (USB-Amersham).

VI.4.3. Oligonucleótidos.

Todos los oligonucleótidos utilizados fueron suministrados por Isogen Bioscience Holanda.

A continuación se detallan las secuencias y características de todos los oligonucleótidos que se utilizaron en este trabajo.

Tabla VI.3. Secuencia de oligonucleótidos diseñados a partir del vector pFI, usados como cebadores universales para la secuenciación y amplificación de fragmentos de ADN clonados en vectores pFI.

Nombre	Secuencia 5´- 3´
PU	GTT TTC CCA GTC ACG ACG TTG TAA
PR	AGC GGA TAA CAA TTT CAC ACA GGA

Tabla VI.4. Secuencia de los oligonucleótidos específicos utilizados en la construcción de los genes 5´UTRP1A/P2Bc100-his6 y 5´UTRP2B/P1Ac96-his6.

Nombre	Secuencia 5´- 3´
UP 5´UTR 1a	TTC TTC TTG TTA TTT TAG AGA TAA T
P2b ATG-3´	ATG AAA TAC TTA GCT GCT TAC TT
5´UTR 2B	TTC TGT TGT TGA TTA ATA GAT A
P1a ATG-3´	ATG TCT ACT GAA TCC GCT TTG

Tabla VI.5. Secuencia de los oligonucleótidos específicos utilizados en la construcción de los genes quiméricos de la serie P1A/P2B.

Nombre	Secuencia 5´- 3´
VB1a 15-5´	AGC CAA AAT CAA GGC GGC G
VB2b 13-3´	GGT GGT AAC GCT GCC CCA
VB1a 22-5´	AGA GAT TTC GAT TTC AGA GTC A
VB2b 20-3´	GCC GCT GAC ATC AAG GCC
VB1a 33-5´	GGC AGC GTT AGT CAA AGT CA
VB2b 30-3´	GTC GGT GCT GAA GTC GAT G
1a 40-5´	GAT ATT TTC AAC TGG GAC ATT GG
2b 36-3´	GAA GCC AGA ATC AAC GAA TTG TT
1a 49-5´	CAA AGC CTT AGC AAA AAT ATC AGC
2b 47-3´	GAA GGT AAG GGC TCT TTG GAA G
1a 53-5´	GTT TTG GCC GTC CAA AGC CTT
2b 52-3´	TTG GAA GAA ATC ATC GCT GAA GG
1a 58-5´	CAA TAA GTC CTT CAA GTT TTG GC
2b 65-3´	ACT GTT CCA ACT GGT GGT GCT

Tabla VI.6. Secuencia de los oligonucleótidos específicos utilizados en la construcción de los genes quiméricos de la serie P2B/P1A.

Nombre	Secuencia 5´ - 3´
VB2b 12-5´	AGC CAA AAT CAA GGC GGC G
VB1a 16-3´	GGT GGT AAC GCT GCC CCA
VB2b 29-5´	AGA GAT TTC GAT TTC AGA GTC A
VB1a 23-3´	GCC GCT GAC ATC AAG GCC
VB2b 29-5´	GGC AGC GTT AGT CAA AGT CA
VB1a 34-3´	GTC GGT GCT GAA GTC GAT G
2b 35-5´	GAT ATT TTC AAC TGG GAC ATT GG
1a 41-3´	GAA GCC AGA ATC AAC GAA TTG TT
2b 46-5´	CAA AGC CTT AGC AAA AAT ATC AGC
1a 50-3´	GAA GGT AAG GGC TCT TTG GAA G
2b 51-5´	GTT TTG GCC GTC CAA AGC CTT
1a 54-3´	TTG GAA GAA ATC ATC GCT GAA GG
2b 64-5´	CAA TAA GTC CTT CAA GTT TTG GC
1a 59-3´	ACT GTT CCA ACT GGT GGT GCT

Tabla VI.7. Secuencia de los oligonucleótidos utilizados en la construcción de los genes quiméricos fusionados al dominio de unión de GAL 4. En azul se señala la secuencia correspondiente a la diana *NruI*.

Nombre	Secuencia 5´ - 3´
Nr1P1A	TAT CGC GAA GAA ATG TCT ACT G
NrP2B	AAT CGC GAA CAG AAA TGA AAT AC
New RV8	AAT CGC GAT ATC TCA GCA TCA GCA TCA CCG GC

Tabla VI.8. Secuencia del oligonucleótido utilizado como sonda para la detección por *Northern* del ARNm de la proteína P1 α .

Nombre	Secuencia 5´ - 3´
SONDA P1a	AGCCAAAATCAAGGCGGCGTAAGACAAAGCGGATTCACTAGACAT

VI.5. MÉTODOS DE TRANSFORMACIÓN CELULAR.

VI.5.1. Transformación de *E. coli*.

Las células se hicieron competentes según el método de cloruro de rubidio (Hanahan, 1985) y se transformaron mediante choque térmico {Hanahan, 1983 #150}.

VI.5.2. Transformación de *S. cerevisiae*.

Las cepas de levadura se hicieron competentes permeabilizando la pared celular según el método del acetato de litio modificado Gietz, 1995), y se transformaron mediante choque térmico (Ito, 1983).

VI.5.2.1. Disrupción Génica.

La cepa D467 fue obtenida a partir de la cepa mutante D47, interrumpiendo el gen RPP1B que codifica la proteína P1 β . La disrupción se realizó transformando la cepa D47 con un módulo de reemplazamiento génico obtenido previamente en nuestro laboratorio (Marcos, A. G, 2005) que contiene el marcador de resistencia a geneticina (*KanMX4*) con fragmentos flanqueantes del gen RPP1A. Se siguió el protocolo descrito en Guldener y col., 1996. Este marcador selectivo, *KanMX4*, codifica una proteína con actividad aminoglicósido fosfotransferasa que confiere resistencia a kanamicina en *E. coli* y a geneticina (G418) en *S. cerevisiae* (Jimenez, 1980), flanqueada por secuencias repetidas *LoxP*.

VI.6. MANIPULACIÓN DE ÁCIDOS NUCLÉICOS.

VI.6.1. Obtención de ADN plasmídico de *E. coli*.

La preparación de ADN plasmídico a partir de células bacterianas se llevó a cabo según el método de la lisis alcalina (Sambrook y col., 1989).

El ADN plasmídico para secuenciar fue purificado en columnas Qiawell (Qiagen), y la secuenciación se realizó en el Servicio Interdepartamental de Investigación (SIdI) de la UAM en un secuenciador automático.

VI.6.2. Obtención de fragmentos de ADN mediante PCR.

Todas las amplificaciones realizadas mediante PCR se hicieron con la finalidad de obtener fragmentos de ADN que posteriormente serían clonados en un vector de expresión, por lo que en todos los casos se usó la *Pwo* ADN polimerasa, ya que esta enzima posee una muy baja tasa de error y además genera extremos romos, lo que facilita el clonaje.

En cada reacción de PCR se añadieron: 0,5 pmol/μl de cada uno de los oligonucleótidos utilizados como cebadores, mezcla de nucleótidos (dNTPs) hasta una concentración final 0,2 mM, MgCl₂ 2mM, el tampón adecuado específico para la *Pwo* ADN polimerasa, 0,04 unidades de enzima/μl, y entre 150 Y 600 pg de ADN molde.

Los programas empleados para la amplificación incluían una desnaturalización previa de 3 min. a 94°C; 30 ciclos que incluían 30 seg. de desnaturalización a 94°C, una hibridación de 30 seg. a una temperatura que dependía de la T_m de los oligonucleótidos utilizados, y un tiempo de polimerización calculado en función de 1 min. por kb de ADN a amplificar a 72 °C. Finalmente se incluyó una incubación a 72 °C durante 3 min. para terminar de amplificar todas las cadenas de ADN.

En las tablas VI.9. y VI.10. se relacionan los genes quiméricos de las series P1A/P2B y P2B/P1A, se indica el gen utilizado como molde y la combinación de oligonucleótidos utilizada en cada reacción de PCR para la obtención de los diferentes productos.

Tabla VI.9. Cebadores y molde utilizados en la construcción de los genes quiméricos de la serie P1A/P2B. Se marcan con una "P" los cebadores que fueron fosforilados.

Gen quimérico	Combinación de cebadores	Molde
15aaP1A/P2B	PU - VB1a 15-5' P	pFI38/5'UTRP2B/P1Ac96-his6
	PR - VB2b 13-3' P	pFI38/5'UTRP1A/P2Bc100-his6
22aaP1A/P2B	PU - VB1a 22-5' P	pFI38/5'UTRP2B/P1Ac96-his6
	PR - VB2b 20-3' P	pFI38/5'UTRP1A/P2Bc100-his6
33aaP1A/P2B	PU - VB1a 33-5' P	pFI38/5'UTRP2B/P1Ac96-his6
	PR - VB2b 30-3' P	pFI38/5'UTRP1A/P2Bc100-his6
40aaP1A/P2B	PU - 1a 40-5' P	pFI38/5'UTRP2B/P1Ac96-his6
	PR - 2b 36-3' P	pFI38/5'UTRP1A/P2Bc100-his6
49aaP1A/P2B	PU - 1a 49-5' P	pFI38/5'UTRP2B/P1Ac96-his6
	PR - 2b 47-3' P	pFI38/5'UTRP1A/P2Bc100-his6
53aaP1A/P2B	PU - 1a 53-5' P	pFI38/5'UTRP2B/P1Ac96-his6
	PR - 2b 52-3' P	pFI38/5'UTRP1A/P2Bc100-his6
58aaP1A/P2B	PU - 1a 58-5' P	pFI38/5'UTRP2B/P1Ac96-his6
	PR - 2b 65-3' P	pFI38/5'UTRP1A/P2Bc100-his6

Tabla VI.10. Cebadores y molde utilizados en la construcción de los genes quiméricos de la serie P2B/P1A. Se marcan con una "P" los cebadores que fueron fosforilados.

Gen quimérico	Combinación de cebadores	Molde
12aaP2B/P1A	PU - VB2b 12-5' P	pFI38/5'UTRP1A/P2Bc100-his6
	PR - VB1a 16-3' P	pFI38/5'UTRP2B/P1Ac96-his6
19aaP2B/P1A	PU - VB2b 19-5' P	pFI38/5'UTRP1A/P2Bc100-his6
	PR - VB1a 23-3' P	pFI38/5'UTRP2B/P1Ac96-his6
29aaP2B/P1A	PU - VB2b 29-5' P	pFI38/5'UTRP1A/P2Bc100-his6
	PR - VB1a 41-3' P	pFI38/5'UTRP2B/P1Ac96-his6
35aaP2B/P1A	PU - 2b 35-5' P	pFI38/5'UTRP1A/P2Bc100-his6
	PR - 1a 50-3' P	pFI38/5'UTRP2B/P1Ac96-his6
46aaP2B/P1A	PU - 2b 46-5' P	pFI38/5'UTRP1A/P2Bc100-his6
	PR - 1a 47-3' P	pFI38/5'UTRP2B/P1Ac96-his6
51aaP2B/P1A	PU - 2b 51-5' P	pFI38/5'UTRP1A/P2Bc100-his6
	PR - 1a 54-3' P	pFI38/5'UTRP2B/P1Ac96-his6
64aaP2B/P1A	PU - 2b 64-5' P	pFI38/5'UTRP1A/P2Bc100-his6
	PR - 1a 59-3' P	pFI38/5'UTRP2B/P1Ac96-his6

En las tablas VI.11. y VI.12. se relacionan los genes quiméricos de las series P1A/P2B y P2B/P1A fusionados al dominio de unión GAL4, se indica el gen utilizado como molde y la combinación de oligonucleótidos utilizada en cada reacción de PCR para la obtención de los diferentes productos.

Tabla VI.11. Cebadores y molde utilizados en la construcción de los genes quiméricos de la serie P1A/P2B fusionados al dominio de unión de GAL 4 (GAL4BD).

Gen quimérico fusionado al dominio de unión de GAL 4	Combinación de cebadores	Molde
15aaP1A/P2B/BD	Nr1P1A-New RV8	pFI38/15aaP1A/P2B
22aaP1A/P2B/BD	Nr1P1A-New RV8	pFI38/22aaP1A/P2B
33aaP1A/P2B/BD	Nr1P1A-New RV8	pFI38/33aaP1A/P2B
40aaP1A/P2B/BD	Nr1P1A-New RV8	pFI38/33aaP1A/P2B
49aaP1A/P2B/BD	Nr1P1A-New RV8	pFI38/49aaP1A/P2B

Tabla VI.12. Cebadores y molde utilizados en la construcción de los genes quiméricos de la serie P2B/P1A fusionados al dominio de unión de GAL 4 (GAL4BD).

Gen quimérico fusionado al dominio de unión de GAL 4	Combinación de cebadores	Molde
12aaP2B/P1A/BD	NrP2B-New RV8	pFI38/12aaP2B/P1A
19aaP2B/P1A/BD	NrP2B-New RV8	pFI38/19aaP2B/P1A
29aaP2B/P1A/BD	NrP2B-New RV8	pFI38/29aaP2B/P1A
35aaP2B/P1A/BD	NrP2B-New RV8	pFI38/35aaP2B/P1A
46aaP2B/P1A/BD	NrP2B-New RV8	pFI38/46aaP2B/P1A

VI.6.3. Purificación de fragmentos de ADN a partir de geles de agarosa.

Para purificar fragmentos de ADN a partir de un gel de agarosa, se cortó la banda deseada y se utilizó el sistema de extracción *QIAquick* de Qiagen para su purificación.

VI.6.4. Obtención de ARN total de *S. cerevisiae*.

Para la obtención de ARN celular total se cultivaron las células de levadura en el medio apropiado. La extracción se hizo siguiendo el protocolo del fenol ácido caliente descrito en *Short Protocols in Molecular Biology* (Ausubel, F. Y col., 1999).

VI.7. TÉCNICAS ELECTROFORÉTICAS.

VI.7.1. Electroforesis de ácidos nucleicos: ADN y ARN.

Los métodos utilizados para separar fragmentos de ADN en geles de agarosa/TAE y los métodos para separar moléculas de ARN se describen en Sambrook y col. (1989).

VI.7.1.1. Detección de moléculas de ARN o *Northern-blot*.

La detección de las moléculas de ARNm específicas se hizo según el método descrito en Sambrook y col. (1989). Para la transferencia se utilizó una membrana de nylon cargada positivamente (Hybond-N+ de Amersham Biosciences). Como sonda se utilizó un oligonucleótido que hibrida entre los nucleótidos 1 y 45 de la ORF del gen RPP1A (ver tabla VI.8) marcada radiactivamente con γ -³²P utilizando la T4 polinucleótido quinasa y como sustrato γ -dATP (10 μ Ci/ml).

VI.7.2. Electroforesis de proteínas.

VI.7.2.1. SDS-PAGE.

Las muestras de proteínas se resolvieron en geles SDS-PAGE (Sambrook y col., 1989) usando un equipo MiniProtean II de BioRad, a temperatura ambiente y a 25mA para un gel y 50mA cuando se resolvían dos geles simultáneamente.

VI.7.2.2. Isoelectroenfoque.

Para separar las proteínas ácidas ribosómicas sobre la base de su punto isoeléctrico, se usó el método de isoelectroenfoque vertical con una mezcla de anfólinas 2-4 (60%) y 2,5-5 (40%) (Zambrano y col., 1997). La tinción de estos geles se realizó con plata.

VI.8. DETECCIÓN INMUNOLÓGICA DE PROTEÍNAS TRANSFERIDAS A MEMBRANA o *WESTERN-BLOT*

Tras separar las proteínas en geles SDS-PAGE, se transfirieron a una membrana de PVDF (Inmobilon, Millipore) que fue humedecida previamente 10 seg. en metanol para su activación. Para la transferencia se utilizó el sistema de transferencia húmeda de BioRad en tampón Tris-HCl 25mM, glicina 192mM y metanol 20%, aplicando durante 45 min. una corriente de 250mA para transferir un gel y de 350mA cuando se transferían dos geles simultáneamente. Una vez finalizada la transferencia, se realizó la detección inmunológica de las proteínas según el método descrito por Towbin y col. (1979).

Todas las diluciones de los anticuerpos primarios se hicieron en la misma solución que se usó para bloquear la membrana. El anticuerpo monoclonal anticarboxilo (3BH5) (Vilella y col., 1991) se diluyó 1:10. El anticuerpo policlonal comercial anti-histidinas (Santa Cruz Biotechnology) se usó a una dilución 1:1000, mientras que los anticuerpos monoclonales de doble híbrido, anti dominio de unión (GAL4 (DBD) (RK5C1): sc-510) y anti dominio de activación (GAL-TA (C-10): sc-1663) (Santa Cruz Biotechnology), se usaron a una dilución 1:200.

El anticuerpo secundario de conejo anti ratón (RαM) se utilizó para los anticuerpos monoclonales, y para los anticuerpos policlonales se usó un anticuerpo secundario de burro anti conejo (DαR) diluyéndose ambos 1:2500 en la misma solución de lavado. Estos anticuerpos secundarios tienen conjugada la enzima peroxidasa para su detección mediante quimioluminiscencia.

VI.9. OBTENCIÓN DE DISTINTAS FRACCIONES CELULARES DE *S. cerevisiae*.

VI.9.1. Obtención de un extracto total de levadura (fracción S30).

La obtención de un extracto total de levadura S30 se realizó siguiendo una modificación de los métodos descritos por Sánchez-Madrid y col., (1979), Kovalchuke y Chakraborty (1994). Se dejaron crecer las células en 150 ml del medio de cultivo adecuado en cada caso hasta una Abs_{600nm} 0,4-0,8 OD. El cultivo se centrifugó durante 5 min. a 5.000 rpm en un rotor Sorvall SS-34 a una temperatura de 4°C y se las células del sedimento se resuspendieron en tampón 1 de levadura (Tris-HCl 100mM, pH 7,4, KCl 20mM, MgCl₂ 12,5 mM, 2-mercaptoetanol o DTT 5mM), volviéndose a centrifugar en las mismas condiciones. El sedimento de células lavadas se resuspendió en tampón 1 al cual previamente se añadió una mezcla de inhibidores de proteasas (aprotinina, antipaina, vestatina, pepstatina, leupeptina, quimiotripsina y PMSF a concentración final de 10µg/ml para cada uno de ellos). Estas células se rompieron mecánicamente con perlas de vidrio mediante agitación durante 30 seg. con parámetro de velocidad de 6.0 en un equipo "Savant Fast prep FP120" (BIO101) a 4°C. Este extracto se centrifugó durante 10 min. a 15.000 rpm en un minifuga a una temperatura de 4°C. Se recogió el sobrenadante, se pasó a otro tubo, y se centrifugó en las mismas condiciones durante otros 10 min. para recoger el sobrenadante o fracción S30.

Cuando interesó obtener un extracto S30 activo, se crecieron las células en 6L del medio de cultivo adecuado en cada caso, hasta una Abs_{600nm} 0,4-0,5 OD y la ruptura se hizo manualmente mediante trituración en mortero con arena de

cuarzo estéril; para ello el sedimento de células se mezcló con la arena a razón de 1 g. de arena / g. de células, en presencia del inhibidor de proteasas PMSF (0,5 μ M/g de células). El proceso de ruptura se llevó a cabo durante 25 min., sobre hielo. Al finalizar el proceso de ruptura, se añadió 0,4 ml de Solución Tampón 1/g de células, y los extractos totales fueron transferidos a tubos de centrifuga. Para eliminar los restos de arena y células sin romper se centrifugó a 15.000 x g (7.000 rpm) durante 10 min. a 4 °C. El sobrenadante que contiene el extracto celular fue centrifugado de nuevo a 30.000 x g (15.000 rpm) durante 30 min. El sobrenadante de esta etapa de centrifugación, cuya recolección fue realizada cuidadosamente, constituye la fracción S30, la cual contiene los ribosomas y las proteínas citosólicas.

La cantidad de proteína total se cuantificó por el método de Bradford (Bradford, 1976).

VI.9.2. Obtención de ribosomas y fracción S100.

Para la obtención de ribosomas se partió de la fracción S30 que se ultracentrifugó a 90.000 rpm durante 1 hora en una ultracentrífuga TL100 (Beckman) con un rotor TL100.2 (Beckman) a una temperatura de 4°C. El sedimento obtenido corresponde a los ribosomas crudos y el sobrenadante a la fracción S100. En el caso de utilizarse estos ribosomas directamente se resuspendieron en tampón 1 y fueron clarificados en una minifuga a 13000 rpm durante 3 min. a 4 °C, a los fines de eliminar otros elementos presentes en la suspensión. Para la obtención de ribosomas lavados o purificados, este sedimento se resuspendió en tampón 2 de alta fuerza iónica (TrisHCl 20mM, pH 7,4, NH₄Ac 500mM, MgCl₂ 100mM, 2-mercaptoetanol o DTT 5mM) y se aplicó sobre un gradiente discontinuo de sacarosa (400 μ l de tampón 2 con sacarosa al 20% sobre 600 μ l de tampón 2 con sacarosa al 40%). Este gradiente se centrifugó a 90.000 rpm durante 2 horas en un rotor TL100.2 a 4°C. El sedimento resultante corresponde a los ribosomas purificados que se resuspendieron en tampón 1 y fueron clarificados en una minifuga a 13000 rpm durante 3 min. a 4 °C. La cuantificación de los ribosomas se realizó midiendo la absorbancia a una longitud de onda de 260 nm, asumiendo que 14 unidades de Abs_{260nm} corresponden a una concentración de ribosomas de 1 mg/ml. La pureza de las preparaciones de ribosomas se determinó midiendo la

absorbancia a 280 nm y cuantificando el coeficiente DO260/DO280 el cual debe estar comprendido en el rango de 1.9 – 2.0, para preparaciones de ribosomas con baja contaminación de proteínas citoplásmicas.

La preparación de ribosomas y extractos S100 activos para ensayos de síntesis de proteína *in vitro* se realizó siguiendo una modificación de los métodos descritos por Sánchez-Madrid y col., (1979) y Kovalchuke y Chakraborty (1994). Tras la centrifugación del extracto S30 durante 2 horas a 48.000 rpm (140.000 x g) en el rotor 70Ti (Beckman) a 4 °C, se obtiene el sobrenadante que corresponde a la fracción S100 y el sedimento en donde se encuentran los ribosomas.

Las proteínas del sobrenadante S100 se precipitaron añadiendo sulfato de amonio ($\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$) al 30% muy lentamente manteniendo el extracto en frío. El sedimento de esta precipitación se descarta, y el sobrenadante se precipita con una solución sulfato de amonio ($\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$) al 70%. Tras centrifugar 15 min. a 15.000 rpm, el sobrenadante se descarta y el sedimento se resuspende en tampón 3 (Tris-HCl, pH 7,4 50 mM, 2-mercaptoetanol 5 mM), y se dializa frente al tampón 3 durante toda la noche a 4 °C. Finalmente la solución se somete a una centrifugación durante 15 min. a 15.000 rpm, y se hacen alícuotas del sobrenadante que se guardan a – 70 °C.

Los ribosomas obtenidos en el sedimento se resuspendieron en 2 ml de solución tampón 2 de levadura de alta fuerza iónica. Esta etapa fue realizada lenta y cuidadosamente, manteniendo los tubos en hielo. La fracción que contiene los ribosomas resuspendidos fue clarificada por centrifugación a 10.000 rpm durante 15 min. a 4 °C. Los ribosomas resuspendidos se centrifugaron sobre un gradiente discontinuo de sacarosa 20% - 40% preparado en solución tampón 2. En tubos de centrífuga se colocaron 12 ml de solución tampón 2 - sacarosa al 40% sobre la cual se añadió 8 ml de solución tampón 2 - sacarosa al 20%. La fracción ribosómica se colocó en el tope del gradiente, 1 ml ribosomas/gradiente y se centrifugó en un rotor 70Ti (Beckman) durante 18 horas a 45.000 rpm (140.000 x g) a 4 °C. Después de esta centrifugación, en condiciones de alta sal los ribosomas purificados se resuspendieron en el menor volumen posible de solución tampón 1.

La concentración de ribosomas de levadura en las preparaciones se determinó midiendo la absorbancia a 260 nm, asumiendo que en una solución de

ribosomas 1 DO_{260nm} corresponde a 18 pmol de monosomas 80S. Se determinó la pureza de las preparaciones de ribosomas como se ha indicado anteriormente, y posteriormente fueron divididas en alícuotas y guardadas a -70 °C.

VI.10. ENSAYOS DE SÍNTESIS DE POLIFENILALANINA

El método utilizado fue el método modificado de Gasior, E. y col. (1979), que consiste en tomar 0,075 DO₂₆₀/tubo de ensayo de fracción S100 (aproximadamente 5 – 10 µl; 0,09 – 0,14 mg de proteína) y 10 picomoles (pmol) de ribosomas 80S, contenidos en aproximadamente 3 – 5 µl (0,6 DO₂₆₀/tubo de ensayo, calculado de acuerdo a la relación: 1DO_{260nm} equivale a 18 pmol de monosomas 80S).

Las dos fracciones se incubaron en un volumen de 50 µl a 30 °C durante 20 min. con los siguientes componentes: Tris-HCl 48 mM pH 7,4; MgCl₂ 12,3 mM; DTT 1 mM; ATP 1 mM; GTP 500 µM; Fosfocreatina 40 mM; creatina fosfokinasa 2 µg; poli(U) 15 µg, ARNt de levadura 25 µg; Phe 36 µM, y 1 µl de [³H]-Phe 128 Ci/mmol.

Una vez concluida la incubación se añadió 1 ml de TCA al 10% frío para detener la reacción. A continuación se hidrolizó la mezcla a 90 °C durante 10 min., se filtró sobre filtros de fibra de vidrio GF/C, lavando tres veces con 4 ml de TCA al 10% y un último lavado con etanol. La radiactividad incorporada como polifenilalanina fue cuantificada, utilizando como líquido de centelleo Optiphase "HiSafe"2.

Los resultados se expresaron en función de pmol de fenilalanina polimerizada/pmol de ribosoma, convirtiendo los resultados de dpm incorporados en pmol de aminoácido de acuerdo a la actividad específica del isótopo, y considerando los pmol de ribosoma utilizados en el ensayo.

VI.11. ENSAYO DE DOBLE HÍBRIDO POR CRECIMIENTO EN SC-URA

El sistema utilizado para determinar interacciones entre proteínas de levadura, fue el ensayo de doble híbrido por crecimiento en placa. Se empleó la

cepa MaV203 que tiene tres marcadores inducibles por Gal4p: *HIS3*, *URA3* y *LACZ*. Los plásmidos utilizados fueron el pBDC y pADC (tabla VI.2).

En todos los casos se cotransformó la levadura con los plásmidos que codifican los genes de las proteínas quiméricas fusionados al dominio de unión GAL4 (pBDC/quimeras) en combinación con los genes de las proteínas P1 α y P2 β fusionados al dominio de activación de GAL4 (pADC/P1 α y pADC/P2 β). Como control negativo de interacción se cotransformó la cepa MAV203 con los plásmidos pBDC/quimeras junto con el pADC vacío. El control positivo de interacción utilizado fue una cepa, obtenida previamente en nuestro laboratorio, que resultó de cotransformar la cepa MAV203 con los plásmidos pBDC/P1 α y pADC/P2 β . Los transformantes se seleccionaron en placas del medio SC-LEU-TRP, dejando crecer las placas durante 3 días en una estufa a 30°C.

Los transformantes seleccionados se crecieron en cultivos líquidos de SC-WL durante toda una noche en un baño a 30°C y con una agitación a 200rpm. De cada uno de los cultivos se hicieron diluciones seriadas, desde 1×10^{-1} OD₆₀₀ hasta 1×10^{-5} OD₆₀₀. Estas diluciones se plaquearon por goteo y por duplicado en placas de SC-LW, como control de crecimiento y en SC-URA para evaluar las posibles interacciones.

Bibliografía

- Agrawal, R. K., Penczek, P., Grassucci, R. A., y Frank, J. (1998). Visualization of elongation factor G on the *Escherichia coli* 70S ribosome: the mechanism of translocation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 6134-6138.
- Andersen, G. R., Nissen, P., y Nyborg, J. (2003). Elongation factors in protein biosynthesis. *Trends Biochem Sci* **28**, 434-441.
- Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith J. A., y Kevin Struhl. (1999). *Short Protocols in Molecular Biology*, Fourth Edition. Harvard Medical School, Boston, MA.
- Ballesta, J. P., yRemacha, M. (1996). The large ribosomal subunit stalk as a regulatory element of the eukaryotic translational machinery. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* **55**, 157-193.
- Ban, N., Nissen, P., Hansen, J., Moore, P. B., y Steitz, T. A. (2000). The complete atomic structure of the large ribosomal subunit at 2.4 Å resolution. *Science* **289**, 905-920.
- Bargis-Surgey, P., Lavergne, J. P., Gonzalo, P., Vard, C., Filhol-Cochet, O., y Reboud, J. P. (1999). Interaction of elongation factor eEF-2 with ribosomal P proteins. *Eur J Biochem* **262**, 606-611.
- Baronas-Lowell, D. M., y Warner, J. R. (1990). Ribosomal protein L30 is dispensable in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **10**, 5235-5243.
- Beckmann, R., Spahn, C. M., Eswar, N., Helmers, J., Penczek, P. A., Sali, A., Frank, J., y Blobel, G. (2001). Architecture of the protein-conducting channel associated with the translating 80S ribosome. *Cell* **107**, 361-372.
- Bocharov, E. V., Sobol, A. G., Pavlov, K. V., Korzhnev, D. M., Jaravine, V. A., Gudkov, A. T., y Arseniev, A. S. (2004). From structure and dynamics of protein L7/L12 to molecular switching in ribosome. *J Biol Chem* **279**, 17697-17706.
- Bonneaud N, Ozier KO, Li GY, Labouesse M, Minvielle SL y Lacroute F (1991) A family of low and high copy replicative, integrative and single- stranded *S. cerevisiae*/*E. coli* shuttle vectors. *Yeast* 7: 609-615.
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254.
- Brodersen, D. E., y Nissen, P. (2005). The social life of ribosomal proteins. *Febs J* **272**, 2098-2108.
- Dabbs ER (1986) Mutant studies on the prokaryotic ribosome. En *Structure, Function, and Genetics of Ribosomes*. Hardesty, B. and Kramer, G. (eds). New York: Springer-Verlag, pp. 733-748.
- Dahlberg, A. E. (1989). The functional role of ribosomal RNA in protein synthesis. *Cell* **57**, 525-529.
- Datta, P. P., Sharma, M. R., Qi, L., Frank, J., y Agrawal, R. K. (2005). Interaction of the G' domain of elongation factor G and the C-terminal domain of ribosomal

- protein L7/L12 during translocation as revealed by cryo-EM. *Mol Cell* **20**, 723-731.
- Draper, D.E. (1996). "Ribosomal protein-ARN interactions". En *Ribosomal ARN: Structure, Evolution, Processing and Function in Protein Biosynthesis*". Zimmerman, R.A. y Dahlberg, A.E. (eds.). CRC Press, Boca Ratón, F.A. pp: 171-197.
- Dey, D., Bochkariov, D. E., Jokhadze, G. G., y Traut, R. R. (1998). Cross-linking of selected residues in the N- and C-terminal domains of *Escherichia coli* protein L7/L12 to other ribosomal proteins and the effect of elongation factor Tu. *J Biol Chem* **273**, 1670-1676.
- Diaconu, M., Kothe, U., Schlunzen, F., Fischer, N., Harms, J. M., Tonevitsky, A. G., Stark, H., Rodnina, M. V., y Wahl, M. C. (2005). Structural basis for the function of the ribosomal L7/12 stalk in factor binding and GTPase activation. *Cell* **121**, 991-1004.
- Dube, P., Bacher, G., Stark, H., Mueller, F., Zemlin, F., van Heel, M., y Brimacombe, R. (1998). Correlation of the expansion segments in mammalian rRNA with the fine structure of the 80 S ribosome; a cryoelectron microscopic reconstruction of the rabbit reticulocyte ribosome at 21 Å resolution. *J Mol Biol* **279**, 403-421.
- el-Baradi, T. T., de Regt, V. C., Einerhand, S. W., Teixido, J., Planta, R. J., Ballesta, J. P., y Raue, H. A. (1987). Ribosomal proteins EL11 from *Escherichia coli* and L15 from *Saccharomyces cerevisiae* bind to the same site in both yeast 26 S and mouse 28 S rRNA. *J Mol Biol* **195**, 909-917.
- Elkon, K. B., Parnassa, A. P., y Foster, C. L. (1985). Lupus autoantibodies target ribosomal P proteins. *J Exp Med* **162**, 459-471.
- Frank, J. (2003). Toward an understanding of the structural basis of translation. *Genome Biol* **4**, 237.
- Gasior, E., Herrera, F., Sadnik, Y., McLaughlin, C. y Moldave, K. (1979). The preparation and characterization of a cell-free system from *Sacharomyces cerevisiae* that translated natural messenger ribonucleic acid. *J. Biol. Chem.*, 254: 3965 – 3969.
- Gavrilova, L. P., Kostiashekina, O. E., Koteliansky, V. E., Rutkevitch, N. M., y Spirin, A. S. (1976). Factor-free ("non-enzymic") and factor-dependent systems of translation of polyuridylic acid by *Escherichia coli* ribosomes. *J Mol Biol* **101**, 537-552.
- Gietz RD, Schiestl RH, Willems AR y Woods RA (1995) Studies on the transformation of intact yeast cells by the LiAc/SS- DNA/PEG procedure. *Yeast* 11: 355-60.
- Girshovich, A. S., Bochkareva, E. S., y Vasiliev, V. D. (1986). Localization of elongation factor Tu on the ribosome. *FEBS Lett* **197**, 192-198.
- Girshovich, A. S., Kurtskhallia, T. V., Ovchinnikov Yu, A., y Vasiliev, V. D. (1981). Localization of the elongation factor G on *Escherichia coli* ribosome. *FEBS Lett* **130**, 54-59.
- Glick, B. R., y Ganoza, M. C. (1976). Characterization and site of action of a soluble protein that stimulates peptide-bond synthesis. *Eur J Biochem* **71**, 483-491.

- Gomez-Lorenzo, M. G., Spahn, C. M., Agrawal, R. K., Grassucci, R. A., Penczek, P., Chakraborty, K., Ballesta, J. P., Lavandera, J. L., Garcia-Bustos, J. F., y Frank, J. (2000). Three-dimensional cryo-electron microscopy localization of EF2 in the *Saccharomyces cerevisiae* 80S ribosome at 17.5 Å resolution. *Embo J* **19**, 2710-2718.
- Gonzalo, P., Lavergne, J. P., y Reboud, J. P. (2001). Pivotal role of the P1 N-terminal domain in the assembly of the mammalian ribosomal stalk and in the proteosynthetic activity. *J Biol Chem* **276**, 19762-19769.
- Gonzalo, P., y Reboud, J. P. (2003). The puzzling lateral flexible stalk of the ribosome. *Biol Cell* **95**, 179-193.
- Grela, P., Helgstrand, M., Krokowski, D., Boguszevska, A., Svergun, D., Liljas, A., Bernado, P., Grankowski, N., Akke, M., y Tchorzewski, M. (2007). Structural characterization of the ribosomal P1A-P2B protein dimer by small-angle X-ray scattering and NMR spectroscopy. *Biochemistry* **46**, 1988-1998.
- Guarinos, E., Remacha, M., y Ballesta, J. P. (2001). Asymmetric interactions between the acidic P1 and P2 proteins in the *Saccharomyces cerevisiae* ribosomal stalk. *J Biol Chem* **276**, 32474-32479.
- Guarinos, E., Santos, C., Sanchez, A., Qiu, D. Y., Remacha, M., y Ballesta, J. P. (2003). Tag-mediated fractionation of yeast ribosome populations proves the monomeric organization of the eukaryotic ribosomal stalk structure. *Mol Microbiol* **50**, 703-712.
- Gudkov, A. T., Bubunencko, M. G., y Gryaznova, O. I. (1991). Overexpression of L7/L12 protein with mutations in its flexible region. *Biochimie* **73**, 1387-1389.
- Gudkov, A. T., Tumanova, L. G., Venyaminov, S. Y., y Khechinashvili, N. N. (1978). Stoichiometry and properties of the complex between ribosomal proteins L7 and L10 in solution. *FEBS Lett* **93**, 215-218.
- Hanahan D (1985) Techniques for transformation of *E. coli*. Pag 109. DNA cloning: a practical approach. D.M. Glover. Oxford, IRL Press.
- Hardesty, B., y Kramer, G. (2001). Folding of a nascent peptide on the ribosome. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* **66**, 41-66.
- Helgstrand, M., Mandava, C. S., Mulder, F. A., Liljas, A., Sanyal, S., y Akke, M. (2007). The Ribosomal Stalk Binds to Translation Factors IF2, EF-Tu, EF-G and RF3 via a Conserved Region of the L12 C-terminal Domain. *J Mol Biol* **365**, 468-479.
- Ilag, L. L., Videler, H., McKay, A. R., Sobott, F., Fucini, P., Nierhaus, K. H., y Robinson, C. V. (2005). Heptameric (L12)₆/L10 rather than canonical pentameric complexes are found by tandem MS of intact ribosomes from thermophilic bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 8192-8197.
- Ito I, Fukuda Y, Murata K y Kimura A (1983) Transformation of intact cells treated with alkali cations. *J Bacteriol* **153**: 163-68.
- Ito, T., Chiba, T., Ozawa, R., Yoshida, M., Hattori, M., y Sakaki, Y. (2001). A comprehensive two-hybrid analysis to explore the yeast protein interactome. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 4569-4574.

- Jiménez A y Davies J (1980) Expression of a transposable antibiotic resistance element in *Saccharomyces*. *Nature* 287 (5785): 869-871.
- Jose, M. P., Santana-Roman, H., Remacha, M., Ballesta, J. P., y Zinker, S. (1995). Eukaryotic acidic phosphoproteins interact with the ribosome through their amino-terminal domain. *Biochemistry* **34**, 7941-7948.
- Kaplan, D., Ferrari, I., Bergami, P. L., Mahler, E., Levitus, G., Chiale, P., Hoebeke, J., Van Regenmortel, M. H., y Levin, M. J. (1997). Antibodies to ribosomal P proteins of *Trypanosoma cruzi* in Chagas disease possess functional autoreactivity with heart tissue and differ from anti-P autoantibodies in lupus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 10301-10306.
- Kischa, K., Moller, W., y Stoffler, G. (1971). Reconstitution of a GTPase activity by a 50S ribosomal protein and *E. coli*. *Nat New Biol* **233**, 62-63.
- Klaholz, B. P., Pape, T., Zavialov, A. V., Myasnikov, A. G., Orlova, E. V., Vestergaard, B., Ehrenberg, M., y van Heel, M. (2003). Structure of the *Escherichia coli* ribosomal termination complex with release factor 2. *Nature* **421**, 90-94.
- Koteliansky, V. E., Domogatsky, S. P., Gudkov, A. T., y Spirin, A. S. (1977). Elongation factor-dependent reactions of ribosomes deprived of proteins L7 and L12. *FEBS Lett* **73**, 6-11.
- Kovalchuk, O. y Chakraborty, K. (1994). Comparative analysis of ribosome-associated adenosinetriphosphatase (ATPase) from pig liver and the ATPase of elongation factor 3 from *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur. J. Biochem.* 226: 133-140.
- Krokowski, D., Boguszewska, A., Abramczyk, D., Liljas, A., Tchorzewski, M., y Grankowski, N. (2006). Yeast ribosomal P0 protein has two separate binding sites for P1/P2 proteins. *Mol Microbiol* **60**, 386-400.
- Kurup, V. P., y Banerjee, B. (2000). Fungal allergens and peptide epitopes. *Peptides* **21**, 589-599.
- Laloti, V. S., Perez-Fernandez, J., Remacha, M., y Ballesta, J. P. (2002). Characterization of interaction sites in the *Saccharomyces cerevisiae* ribosomal stalk components. *Mol Microbiol* **46**, 719-729.
- Liljas, A. (2004). *Structural Aspects of Protein Synthesis*. Singapore: World Scientific Publishing.
- Marcos, A. G. (2005). Estudios in vivo e in vitro del tallo ribosómico de *Saccharomyces cerevisiae* mediante técnicas biofísicas y bioquímicas. Tesis doctoral. Universidad Autónoma de Madrid, Departamento de Biología Molecular.
- Marquis, D. M., Fahnestock, S. R., Henderson, E., Woo, D., Schwinge, S., Clark, M. W., y Lake, J. A. (1981). The L7/L12 stalk, a conserved feature of the prokaryotic ribosome, is attached to the large subunit through its N terminus. *J Mol Biol* **150**, 121-132.
- McGuffin, L. J., Bryson, K., y Jones, D. T. (2000). The PSIPRED protein structure prediction server. *Bioinformatics* 16, 404-405.

- Menetret, J. F., Neuhoef, A., Morgan, D. G., Plath, K., Radermacher, M., Rapoport, T. A., y Akey, C. W. (2000). The structure of ribosome-channel complexes engaged in protein translocation. *Mol Cell* **6**, 1219-1232.
- Merrick, W. C. (2004). Cap-dependent and cap-independent translation in eukaryotic systems. *Gene* **332**, 1-11.
- Millson SH, Truman AW, Piper PW.(2003) Vectors for N- or C-terminal positioning of the yeast Gal4p DNA binding or activator domains. *Biotechniques*. 35(1): 60-4.
- Moller, W., Slobin, L. I., Amons, R., y Richter, D. (1975). Isolation and characterization of two acidic proteins of 60s ribosomes from *Artemia salina* cysts. *Proc Natl Acad Sci U S A* **72**, 4744-4748.
- Montesano-Roditis, L., Glitz, D. G., Traut, R. R., y Stewart, P. L. (2001). Cryo-electron microscopic localization of protein L7/L12 within the *Escherichia coli* 70 S ribosome by difference mapping and Nanogold labeling. *J Biol Chem* **276**, 14117-14123.
- Naganuma, T., Shiogama, K., y Uchiumi, T. (2007). The N-terminal regions of eukaryotic acidic phosphoproteins P1 and P2 are crucial for heterodimerization and assembly into the ribosomal GTPase-associated center. *Genes Cells* 12, 501-510.
- Nusspaumer, G., Remacha, M., y Ballesta, J. P. (2000). Phosphorylation and N-terminal region of yeast ribosomal protein P1 mediate its degradation, which is prevented by protein P2. *Embo J* **19**, 6075-6084.
- Oakes, M., Scheinman, A., Rivera, M., Soufer, D., Shankweiler, G., y Lake, J. (1987). Evolving ribosome structure and function: rRNA and the translation mechanism. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **52**, 675-685.
- Olson, H. M., Grant, P. G., Cooperman, B. S., y Glitz, D. G. (1982). Immunoelectron microscopic localization of puromycin binding on the large subunit of the *Escherichia coli* ribosome. *J Biol Chem* **257**, 2649-2656.
- Perez-Fernandez, J., Remacha, M., y Ballesta, J. P. (2005). The acidic protein binding site is partially hidden in the free *Saccharomyces cerevisiae* ribosomal stalk protein P0. *Biochemistry* **44**, 5532-5540.
- Pettersson, I., Hardy, S. J., y Liljas, A. (1976). The ribosomal protein L8 is a complex L7/L12 and L10. *FEBS Lett* **64**, 135-138.
- Qiu, D. (2004) Study of the *Saccharomyces cerevisiae* ribosomal stalk interactions with other ribosomal components using chemical cross-linking. Tesis doctoral. Universidad Autónoma de Madrid, Departamento de Biología Molecular.
- Qiu, D., Parada, P., Marcos, A. G., Cardenas, D., Remacha, M., y Ballesta, J. P. (2006). Different roles of P1 and P2 *Saccharomyces cerevisiae* ribosomal stalk proteins revealed by cross-linking. *Mol Microbiol* **62**, 1191-1202.
- Ramagopal, S. (1976). Accumulation of free ribosomal proteins S1, L7, and L12 in *Escherichia coli*. *Eur J Biochem* **69**, 289-297.
- Rawat, U. B., Zavialov, A. V., Sengupta, J., Valle, M., Grassucci, R. A., Linde, J., Vestergaard, B., Ehrenberg, M., y Frank, J. (2003). A cryo-electron microscopic study of ribosome-bound termination factor RF2. *Nature* **421**, 87-90.

- Remacha, M., Jimenez-Diaz, A., Bermejo, B., Rodriguez-Gabriel, M. A., Guarinos, E., y Ballesta, J. P. (1995). Ribosomal acidic phosphoproteins P1 and P2 are not required for cell viability but regulate the pattern of protein expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **15**, 4754-4762.
- Remacha, M., Santos, C., y Ballesta, J. P. (1990). Disruption of single-copy genes encoding acidic ribosomal proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **10**, 2182-2190.
- Remacha, M., Santos, C., Bermejo, B., Naranda, T., y Ballesta, J. P. (1992). Stable binding of the eukaryotic acidic phosphoproteins to the ribosome is not an absolute requirement for in vivo protein synthesis. *J Biol Chem* **267**, 12061-12067.
- Rich, B. E., y Steitz, J. A. (1987). Human acidic ribosomal phosphoproteins P0, P1, and P2: analysis of cDNA clones, in vitro synthesis, and assembly. *Mol Cell Biol* **7**, 4065-4074.
- Rodriguez-Gabriel, M. A., Remacha, M., y Ballesta, J. P. (1998). Phosphorylation of ribosomal protein P0 is not essential for ribosome function but can affect translation. *Biochemistry* **37**, 16620-16626.
- Saenz-Robles, M. T., Remacha, M., Vilella, M. D., Zinker, S., y Ballesta, J. P. (1990). The acidic ribosomal proteins as regulators of the eukaryotic ribosomal activity. *Biochim Biophys Acta* **1050**, 51-55.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989). *Molecular Cloning. A Laboratory Manual* (Second Edition). Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Sanchez-Madrid, F., Reyes, R., Conde, P., y Ballesta, J. P. (1979). Acidic ribosomal proteins from eukaryotic cells. Effect on ribosomal functions. *Eur J Biochem* **98**, 409-416.
- Sanchez-Madrid, F., Vidales, F. J., y Ballesta, J. P. (1981). Functional role of acidic ribosomal proteins. Interchangeability of proteins from bacterial and eukaryotic cells. *Biochemistry* **20**, 3263-3266.
- Santos, C., y Ballesta, J. P. (1994). Ribosomal protein P0, contrary to phosphoproteins P1 and P2, is required for ribosome activity and *Saccharomyces cerevisiae* viability. *J Biol Chem* **269**, 15689-15696.
- Santos, C., y Ballesta, J. P. (1995). The highly conserved protein P0 carboxyl end is essential for ribosome activity only in the absence of proteins P1 and P2. *J Biol Chem* **270**, 20608-20614.
- Santos, C., y Ballesta, J. P. (2005). Characterization of the 26S rRNA-binding domain in *Saccharomyces cerevisiae* ribosomal stalk phosphoprotein P0. *Mol Microbiol* **58**, 217-226.
- Santos, C., Rodriguez-Gabriel, M. A., Remacha, M., y Ballesta, J. P. (2004). Ribosomal P0 protein domain involved in selectivity of antifungal sordarin derivatives. *Antimicrob Agents Chemother* **48**, 2930-2936.

- Savelsbergh, A., Mohr, D., Wilden, B., Wintermeyer, W., y Rodnina, M. V. (2000). Stimulation of the GTPase activity of translation elongation factor G by ribosomal protein L7/12. *J Biol Chem* **275**, 890-894.
- Schlueder, F., Tocilj, A., Zarivach, R., Harms, J., Gluehmann, M., Janell, D., Bashan, A., Bartels, H., Agmon, I., Franceschi, F., y Yonath, A. (2000). Structure of functionally activated small ribosomal subunit at 3.3 angstroms resolution. *Cell* **102**, 615-623.
- Schuwirth, B. S., Borovinskaya, M. A., Hau, C. W., Zhang, W., Vila-Sanjurjo, A., Holton, J. M., y Cate, J. H. (2005). Structures of the bacterial ribosome at 3.5 Å resolution. *Science* **310**, 827-834.
- Shimmin, L. C., Ramirez, C., Matheson, A. T., y Dennis, P. P. (1989). Sequence alignment and evolutionary comparison of the L10 equivalent and L12 equivalent ribosomal proteins from archaeobacteria, eubacteria, and eucaryotes. *J Mol Evol* **29**, 448-462.
- Spahn, C. M., Beckmann, R., Eswar, N., Penczek, P. A., Sali, A., Blobel, G., y Frank, J. (2001). Structure of the 80S ribosome from *Saccharomyces cerevisiae*--tRNA-ribosome and subunit-subunit interactions. *Cell* **107**, 373-386.
- Spahn, C. M., Gomez-Lorenzo, M. G., Grassucci, R. A., Jorgensen, R., Andersen, G. R., Beckmann, R., Penczek, P. A., Ballesta, J. P., y Frank, J. (2004). Domain movements of elongation factor eEF2 and the eukaryotic 80S ribosome facilitate tRNA translocation. *Embo J* **23**, 1008-1019.
- Stark, H., Rodnina, M. V., Rinke-Appel, J., Brimacombe, R., Wintermeyer, W., y van Heel, M. (1997). Visualization of elongation factor Tu on the *Escherichia coli* ribosome. *Nature* **389**, 403-406.
- Szick, K., Springer, M., y Bailey-Serres, J. (1998). Evolutionary analyses of the 12-kDa acidic ribosomal P-proteins reveal a distinct protein of higher plant ribosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 2378-2383.
- Tchorzewski, M., Boldyreff, B., Issinger, O., y Grankowski, N. (2000). Analysis of the protein-protein interactions between the human acidic ribosomal P-proteins: evaluation by the two hybrid system. *Int J Biochem Cell Biol* **32**, 737-746.
- Tchorzewski, M., Krokowski, D., Boguszewska, A., Liljas, A., y Grankowski, N. (2003). Structural characterization of yeast acidic ribosomal P proteins forming the P1A-P2B heterocomplex. *Biochemistry* **42**, 3399-3408.
- Tenson, T., y Mankin, A. (2006). Antibiotics and the ribosome. *Mol Microbiol* **59**, 1664-1677.
- Towbin H, Ramjoue HP, Kuster H, Liverani D, Gordon J (1982) Monoclonal antibodies against eukaryotic ribosomes. Use to characterize a ribosomal protein not previously identified and antigenically related to the acidic phosphoproteins P1/P2. *J Biol Chem* 257: 12709-12715.
- Tsurugi, K., Collatz, E., Todokoro, K., Ulbrich, N., Lightfoot, H. N., y Wool, I. G. (1978). Isolation of eukaryotic ribosomal proteins. Purification and characterization of the 60 S ribosomal subunit proteins La, Lb, Lf, P1, P2, L13', L14, L18', L20, and L38. *J Biol Chem* **253**, 946-955.

- Tsurugi, K., y Ogata, K. (1985). Evidence for the exchangeability of acidic ribosomal proteins on cytoplasmic ribosomes in regenerating rat liver. *J Biochem (Tokyo)* **98**, 1427-1431.
- Uchiumi, T., Honma, S., Nomura, T., Dabbs, E. R., y Hachimori, A. (2002). Translation elongation by a hybrid ribosome in which proteins at the GTPase center of the *Escherichia coli* ribosome are replaced with rat counterparts. *J Biol Chem* **277**, 3857-3862.
- Uchiumi, T., Wahba, A. J., y Traut, R. R. (1987). Topography and stoichiometry of acidic proteins in large ribosomal subunits from *Artemia salina* as determined by crosslinking. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**, 5580-5584.
- Vard, C., Guillot, D., Bargis, P., Lavergne, J. P., y Reboud, J. P. (1997). A specific role for the phosphorylation of mammalian acidic ribosomal protein P2. *J Biol Chem* **272**, 20259-20262.
- Verschoor, A., Warner, J. R., Srivastava, S., Grassucci, R. A., y Frank, J. (1998). Three-dimensional structure of the yeast ribosome. *Nucleic Acids Res* **26**, 655-661.
- Vidales, F. J., Robles, M. T., y Ballesta, J. P. (1984). Acidic proteins of the large ribosomal subunit in *Saccharomyces cerevisiae*. Effect of phosphorylation. *Biochemistry* **23**, 390-396.
- Vilella MD, Remacha M, Ortiz BL, Méndez E, Ballesta JP (1991) Characterization of the yeast acidic ribosomal phosphoproteins using monoclonal antibodies. Proteins L44/L45 and L44' have different functional roles. *Eur J Biochem* 196 (2): 407-414.
- Wahl, M. C., Huber, R., Marinkovic, S., Weyher-Stingl, E., y Ehlert, S. (2000). Structural investigations of the highly flexible recombinant ribosomal protein L12 from *Thermotoga maritima*. *Biol Chem* 381, 221-229.
- Wahl, M. C., y Moller, W. (2002). Structure and function of the acidic ribosomal stalk proteins. *Curr Protein Pept Sci* **3**, 93-106.
- Warner, J. R. (1989). Synthesis of ribosomes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Rev* **53**, 256-271.
- Weissbach, H., Redfield, E., Yamasaki, E., y Brot, N. (1972). Interaction of a Phe-tRNA-Tu-GTP complex with ribosomal subunits. *Arch Biochem Biophys* **149**, 560-562.
- Wool, I. G., Chan, Y. L., Gluck, A., y Suzuki, K. (1991). The primary structure of rat ribosomal proteins P0, P1, and P2 and a proposal for a uniform nomenclature for mammalian and yeast ribosomal proteins. *Biochimie* **73**, 861-870.
- Yusupov, M. M., Yusupova, G. Z., Baucom, A., Lieberman, K., Earnest, T. N., Cate, J. H., y Noller, H. F. (2001). Crystal structure of the ribosome at 5.5 Å resolution. *Science* **292**, 883-896.
- Zambrano, R., Briones, E., Remacha, M., y Ballesta, J. P. (1997). Phosphorylation of the acidic ribosomal P proteins in *Saccharomyces cerevisiae*: a reappraisal. *Biochemistry* **36**, 14439-14446.

- Zecherle, G. N., Oleinikov, A., y Traut, R. R. (1992). The proximity of the C-terminal domain of Escherichia coli ribosomal protein L7/L12 to L10 determined by cysteine site-directed mutagenesis and protein-protein cross-linking. *J Biol Chem* **267**, 5889-5896.
- Zinker, S. (1980). P5/P5' the acidic ribosomal phosphoproteins from *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta* **606**, 76-82.
- Zinker, S., y Warner, J. R. (1976). The ribosomal proteins of *Saccharomyces cerevisiae*. Phosphorylated and exchangeable proteins. *J Biol Chem* **251**, 1799-1807.
- Zurdo, J., Gonzalez, C., Sanz, J. M., Rico, M., Remacha, M., y Ballesta, J. P. (2000a). Structural differences between *Saccharomyces cerevisiae* ribosomal stalk proteins P1 and P2 support their functional diversity. *Biochemistry* **39**, 8935-8943.
- Zurdo, J., Parada, P., van den Berg, A., Nusspaumer, G., Jimenez-Diaz, A., Remacha, M., y Ballesta, J. P. (2000b). Assembly of *Saccharomyces cerevisiae* ribosomal stalk: binding of P1 proteins is required for the interaction of P2 proteins. *Biochemistry* **39**, 8929-8934.
- Zurdo, J., Sanz, J. M., Gonzalez, C., Rico, M., y Ballesta, J. P. (1997). The exchangeable yeast ribosomal acidic protein YP2beta shows characteristics of a partly folded state under physiological conditions. *Biochemistry* **36**, 9625-9635.

Apéndice

ABREVIATURAS Y SIGLAS

aa	Aminoácidos
Abs	Absorbancia
ADN	Ácido desoxiribonucleico
Amp	Ampicilina
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ARS	Secuencia de replicación autónoma
BSA	Seroalbúmina bovina
°C	grados centígrados
CEN	secuencias centroméricas
col.	colaboradores
g	Unidades de fuerza centrífuga
GTP	Guanosina-5'-tri-fosfato.
IEF	Isoelectroenfoque
Kb	Kilo base
kDa.	Kilo Dalton
LEU	Leucina
µg	microgramos
µl	microlitros
ml	mililitros
min.	minutos
nm.	Nanómetros
ORF	Fase de lectura abierta
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
phe	fenilalanina
pI	Punto Isoeléctrico
pmol	picomoles
PMSF	Floururo de fenilmetilsulfonilo.
rpm	Revoluciones por minuto
SDS	Dodecilsulfato de sodio (Laurilsulfato de sodio)
SDS-PAGE	Electroforésis en gel de poliacrilamida y SDS
S	Coeficiente de sedimentación
S30	Extracto total de células de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .
S100	Sobrenadante que queda después de extraer ribosomas.
TAE	Tampón Tris-acetato EDTA

TBS	Tampón Tris salino
TCA	Ácido tri-cloroacético
T _m	Temperatura de hibridación
Tris	Tris-(hidroximetil)-aminometano
TRP	Triptófano
URA	Uracilo
UTR	Región no traducida
X-gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil-b-D-galactopiranosido